

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



Caracterização Imunohistoquímica e Molecular de Amostras de Endométrio de Cadela com Piómetra

Tese de dissertação para obtenção do grau de

Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Discente: Sandra Isabel Constantino Vieira de Carvalho

Orientadora: Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Luísa Freire Leal Mateus

Março, 2014

Dedicatória

Nem toda a distância é ausência, nem todo o silêncio é esquecimento

...para ti Pai

Agradecimentos

Ao longo da realização deste trabalho muitas foram as pessoas que contribuíram com a sua amizade, compreensão e sabedoria. Assim sendo, e como não podia deixar de ser, aqui fica o meu muito obrigado a todas elas:

À Doutora Elisabete Silva o meu muito obrigado por ter aceite a tarefa de me orientar e guiar nesta importante etapa da minha vida, agradeço o tempo e sabedoria investidos.

À professora Doutora Luísa Mateus, minha co-orientadora, pelo apoio, orientação e mestria com que me auxiliou.

À Professora Conceição Peleteiro, agradeço como diretora do Laboratório de Anatomia Patológica, como chefe, como amiga e como grande mentora dos desafios da vida.

Ao Mestre Hugo Pissarra, a Dr^a Rute Noiva e ao Dr^o João Cota o meu sincero agradecimento pelo apoio constante, por todos os ensinamentos e amizade demonstrados ao longo destes anos.

Às minhas colegas Maria do Rosário Luís, Maria Augusta e Maria Manuela por toda a amizade demonstrada no dia-a-dia do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade de Lisboa (FMV-UL).

À Sofia Henriques, pela imensa ajuda na elaboração deste trabalho, por todo o apoio prestado nos momentos mais difíceis, por toda a paciência e amizade.

Aos meus pais, José Vieira e Maria do Céu Vieira, porque sem eles não estaria aqui, pela capacidade de serem ao mesmo tempo excelentes pais e ótimos amigos, por todos os sacrifícios que fizeram para meu benefício, por todo o apoio e amor, sempre.

Ao meu marido e grande companheiro, Pedro de Carvalho, por todos os momentos de apoio sempre incondicional em todas as fases e lutas da minha vida, pelo amor e carinho que sempre demonstrou e aos quais me habituou. Aos meus filhotes, Beatriz e Miguel pelos dias e noites de ausência.

A todos, o meu sincero Obrigada!

Trabalhos científicos

Este trabalho está inserido no projecto “Contribuição para o estudo da fisiopatologia do complexo hiperplasia quística do endométrio-piometra na cadela”, Refª CIISA/FMV74- Hiperplasia do endométrio, financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA)/Faculdade de Medicina Veterinária (FMV).

Parte do trabalho realizado foi submetido e aceite no VI Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias a decorrer entre os dias 3 e 5 de Abril de 2014, no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) em Oeiras, Lisboa com os seguintes títulos:

Comunicação em painel:

Caracterização da população de células de reação inflamatória em úteros de cadela com piometra

Carvalho S^{1,2}, Pissarra H², Henrique S², Mateus L², Silva E²

¹-Estudante de Mestrado em Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal

²-CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal

Comunicação oral:

Caracterização da resposta imunitária inata no endométrio de cadela com piometra

Silva E¹, Carvalho S^{1,2}, Henrique S¹, Lopes-da-Costa L¹, Mateus L¹

¹-CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal

²-Estudante de Mestrado em Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal

Resumo

CARACTERIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE ENDOMÉTRIO DE CADELA COM PIÓMETRA

A piómetra é uma doença de diestro comum em cadelas adultas, sendo *Escherichia coli* a bactéria mais frequentemente isolada. A resposta inflamatória é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que contribuem para o recrutamento de células de reação inflamatória para o útero. Pretendeu-se com este estudo caracterizar o tipo e a localização das células de reação inflamatória em úteros com piómetra, bem como avaliar a transcrição de genes que codificam para componentes das vias de sinalização dos TLRs e de mediadores da inflamação, em comparação com úteros sem afeção de cadelas em diestro. Todos os casos de piómetra apresentaram um intenso infiltrado de células mielóides e linfócitos B e um infiltrado moderado de linfócitos T. Verificou-se que os transcritos dos componentes da via dependente e independente de MyD88 estão presentes no endométrio de cadelas com piómetra e de cadelas sem afeção uterina. Apenas os mRNAs das citocinas IL-1 β e TNF- α , avaliados por RT-PCR, foram detetados exclusivamente nos casos de piómetra. A transcrição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-8 e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , avaliada por PCR em tempo real, foi superior nas amostras de piómetra. Os transcritos da IL-2, IL-4, IFN- β e IFN- γ não foram detetados em ambos os grupos e os genes das metaloproteinases 1 e 9 apresentaram níveis de transcrição superiores nas amostras de endométrio de cadelas com piómetra.

Podemos concluir que a natureza e distribuição das células de reação inflamatória em úteros com piómetra refletem uma resposta inflamatória crónica e associada à gravidade da doença. A resposta inflamatória induzida pelos TLRs é ainda caracterizada por um aumento na transcrição de mediadores de inflamação, que poderão funcionar como marcadores desta doença. Por outro lado, a ausência do mRNA para os interferões poderá ser explicada pelo facto de estes serem transcritos numa fase inicial da infeção.

Palavras-chave: Piómetra canina, *Escherichia coli*, Resposta inflamatória, Imunidade inata

Abstract

Pyometra is a common diestrous disease of female dogs, being *Escherichia coli* (*E. coli*) the bacterium most commonly isolated. Uterine inflammatory response towards *E. coli* is characterized by the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines that contribute to the recruitment of inflammatory cells to the uterus. The aim of this study was to characterize the type and distribution of inflammatory cells and evaluate the gene transcription of key components of TLRs signalling pathways and of inflammatory mediators in pyometra uteri. All pyometra uteri were characterized by a strong stromal infiltration of myeloid cells (granulocytes/macrophages) and B lymphocytes and a moderate infiltration of T lymphocytes. The MyD88-dependent and independent pathways transcripts were detected in healthy diestrous and pyometra endometria. IL-1 β and TNF- α mRNAs were only detected in pyometra endometria. IL-2, IL-4, IFN- β and IFN- γ transcripts were not detected in both groups. Transcription of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 and anti-inflammatory IL-10 and TGF- β were significantly increased in pyometra endometria compared with healthy endometria. Genes encoding matrix metalloproteinases 1 and 9, implicated in degradation of extracellular matrix components, were also up-regulated in pyometra endometria. In conclusion, the type and distribution of the inflammatory cells in pyometra uteri reflects an ongoing inflammatory response and are associated with the severity of the disease. Also, it was demonstrated that TLRs induced an inflammatory response characterized by an increase in transcription of specific inflammatory related genes. Although the participation of the MyD88 independent pathway in the host defense against *E. coli* during canine pyometra is not completely elucidated, the absence of transcripts for the interferon family members may be explained by an early synthesis of these mediators.

Keywords: Canine Pyometra, *Escherichia coli*, Inflammatory response, Innate immunity

Índice

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Trabalhos científicos.....	iii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de abreviaturas	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Ciclo éstrico da cadela	1
1.1.1. Proestro.....	1
1.1.2. Estro.....	2
1.1.3. Diestro	2
1.1.4. Anestro	3
1.2. Complexo Hiperplasia Quística do endométrio-piometra	3
1.2.1. Etiopatogenia.....	5
1.3. Imunidade inata e imunidade adaptativa	6
1.3.1. Recetores do tipo <i>Toll</i>	7
1.3.2. Detecção de PAMPs bacterianos pelos TLRs	10
1.3.3. Recetores do tipo <i>Toll</i> no útero da cadela	10
1.3.4. Citocinas	11
1.3.5. Metaloproteinases.....	14
1.4. Objetivos.....	15
2. Material e Métodos	16
2.1. Amostras	16
2.2. Caracterização histopatológica das amostras.....	16
2.3. Imunolocalização de células de reação inflamatória no útero de cadelas.....	17

2.4. Análise semi-quantitativa das marcações das células de reação inflamatória	19
2.5. Avaliação da transcrição por transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	20
2.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	20
2.5.2. PCR convencional.....	21
2.6. Quantificação da expressão de mRNA por PCR em tempo real	24
2.7. Análise estatística	25
3. Resultados.....	26
3.1. Avaliação histopatológica do útero de cadelas diagnosticadas com piómetra	26
3.2. Imunolocalização de células de reação inflamatória no útero de cadelas com piómetra e cadelas em diestro sem alterações uterinas.....	30
3.2.1. Avaliação qualitativa da infiltração de células de reação inflamatória na camada basal e apical do endométrio por imunohistoquímica.....	30
3.2.2. Avaliação semi-quantitativa da infiltração de células de reação inflamatória no estroma e glândulas	35
3.3. Transcrição de genes que codificam para componentes das vias de sinalização dos recetores do tipo <i>Toll</i> e de mediadores de inflamação	39
3.4. Quantificação da expressão de mRNA de componentes envolvidos na resposta imunitária, por PCR em tempo real	42
4. Discussão	46
5. Conclusão.....	52
6. Bibliografia	53

Índice de Figuras

Figura 1- Ciclo éstrico da cadela (Adaptado de P. L. Senger, 2003).....	1
Figura 2- Vias de sinalização dos recetores do tipo <i>Toll</i> (Adaptado de O'Neill <i>et al.</i> , 2009).	9
Figura 3- Exemplos de alterações histopatológicas em úteros de cadelas diagnosticadas com piómetra, cortes histológicos do útero corados com HE.	28
Figura 4- Exemplos de alterações histopatológicas em úteros de cadelas diagnosticadas com piómetra, cortes histológicos do útero corados com HE.	29
Figura 5- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de linfócitos T (anticorpo anti-CD3).	31
Figura 6- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de linfócitos B (anticorpo anti-CD79 α cy).	32
Figura 7- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de linfócitos B (anticorpo anti-PAX5).	33
Figura 8- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de granulócitos e macrófagos (anticorpo anti-calprotectina-MAC 387).	34
Figura 9- Percentagem de úteros de cadelas com piómetra e cadelas em diestro sem afeção uterina com infiltração de células de reação inflamatória nas regiões basal e apical do útero: linfócitos T (anticorpo anti-CD3), linfócitos B (anticorpo anti-CD79 α cy e anti-PAX5) e células da linha mielóide (anti-calprotectina, anticorpo MAC 387), avaliado por imunohistoquímica.	35
Figura 10- Cortes histológicos exemplificativos do grau de intensidade do infiltrado de células de reação inflamatória, avaliado por imunohistoquímica, no estroma de úteros com piómetra e em diestro sem afeção uterina.	36

Figura 11- Cortes histológicos exemplificativos dos graus de intensidade do infiltrado de células de reação inflamatória, avaliado por imunohistoquímica, nas glândulas de úteros com piómetra e em diestro sem afeção uterina.	38
Figura 12– Exemplo dos produtos de amplificação obtidos por RT-PCR na detecção do mRNA dos componentes das vias de sinalização dos TLRs, dependente e independente de MyD88, em amostras de endométrio de úteros com piómetra e de úteros na fase de diestro sem afeção uterina.	40
Figura 13 - Exemplo dos produtos de amplificação obtidos por RT-PCR para os transcritos das citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de endométrio de úteros com piómetra e em amostras de endométrio de úteros sem afeção uterina (diestro normal).	41
Figura 14- Expressão relativa do mRNA (Unidades Arbitrárias-UA) dos recetores, TLR2, TLR4 e CD14 avaliado por PCR em tempo real em amostras de endométrio de cadelas com piómetra (n=17) e em amostras de endométrio controlo sem afeção uterina (diestro normal) (n=5).	43
Figura 15- Expressão relativa do mRNA (Unidades Arbitrárias-UA) das citocinas pró e anti-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- β , por PCR em tempo real, em amostras de endométrio de úteros com piómetra (n=17) e de úteros sem afeção (n=5).	44
Figura 16- Resultados da quantificação relativa (Unidades Arbitrárias-UA) dos mRNAs da MMP1 e MMP9 por PCR em tempo real em amostras de endométrio de úteros com piómetra comparativamente a amostras de endométrio de úteros sem afeção (diestro normal).	45

Índice de Tabelas

Tabela 1- Principais citocinas associadas à resposta inflamatória (Adaptado de Arosa <i>et al.</i> , 2012)	12
Tabela 2- Anticorpos utilizados na realização da técnica de imunohistoquímica para identificação das células de reação inflamatória nas amostras em estudo.....	19
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores usados nas diferentes reações de PCR convencional	22
Tabela 4- Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de PCR em Tempo real	25
Tabela 6- Classificação imunohistoquímica do grau de infiltração de células de reação inflamatória no estroma de úteros com piómetra e de úteros em diestro sem afeção uterina.....	37
Tabela 7- Classificação imunohistoquímica do grau de infiltração de células de reação inflamatória nas glândulas de úteros com piómetra e úteros em diestro sem afeção uterina.....	39
Tabela 8- Prevalência (%) dos transcritos dos componentes das vias dependente e independente de MyD88 e dos mediadores de inflamação detetados nas amostras de endométrio de cadelas com piómetra e amostras de endométrio de cadelas sem afeção uterina.....	42

Lista de abreviaturas

BLAST	<i>Basic local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina bovina sérica
CD14	<i>Cluster</i> de diferenciação 14
cDNA	DNA complementar
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CN	Controlo negativo
DAB	Diaminobenzidina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade de Lisboa
HE	Hematoxilina-Eosina
HQE	Hiperplasia Quística do Endométrio
HQE-P	Complexo Hiperplasia Quística – Piómetra
ID	Início de diestro
IFN	Interferão
IFN-I	Interferão tipo 1
IFN- β	Interferão- β
IFN- γ	Interferão- γ
IKKi	<i>Inhibitor of NFkB (IkB) kinase</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IRF	Fator regulador do interferão
IRF-3	Fator regulador do interferão 3
IRF-7	Fator regulador do interferão 7
LH	Hormona luteinizante
MAP	Proteínas ativadas por mitógenos
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NF κ B	Fator nuclear-kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
OVH	Ovariohisterectomia
PAMPs	Padrões moleculares associados a agentes patogénicos
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMNs	Polimorfonucleares
PRR	Recetores de reconhecimento padrão
RE	Reticulo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TGF- β	Fator de crescimento transformador - β
TIR	Domínio intracelular homólogo ao do <i>Toll</i> /recetor de IL-1
TIRAP/MAL	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TLRs	Recetores do tipo <i>toll</i> (TLR1-TLR13)
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRAF3	Fator 3 associado ao recetor do TNF
TRAF6	Fator 6 associado ao recetor do TNF
TRAM/TICAM2	Molécula adaptadora relacionada com TRIF
TRIF	Proteína adaptadora que contém o domínio TIR, indutora de interferão- β

1. Introdução

1.1. Ciclo éstrico da cadela

O ciclo éstrico da cadela é dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro correspondendo o proestro à fase folicular e o estro e o diestro à fase luteínica (Figura 1).

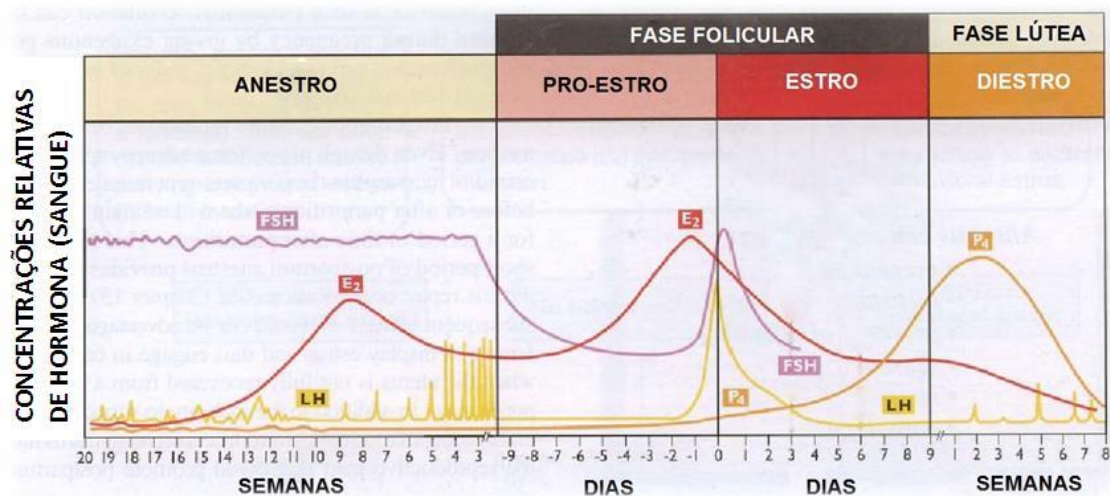


Figura 1- Ciclo éstrico da cadela (Adaptado de P. L. Senger, 2003)

1.1.1. Proestro

O proestro tem uma duração aproximada de 9 dias (podendo variar entre os 2 e os 15 dias), durante os quais as cadelas atraem os machos mas não estão recetivas sexualmente. Em termos hormonais observa-se um aumento das concentrações séricas de estradiol-17β produzidos pelos folículos ovários em crescimento. Em termos clínicos, esta fase é caracterizada por edema e turgidez vulvar, edema das pregas da mucosa vaginal e aparecimento de corrimento vulvar sanguinolento (Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2010). Em termos citológicos, esta fase é caracterizada por uma proliferação das células do epitélio da mucosa vaginal, com predomínio das células intermédias e parabasais. Outras alterações que caracterizam esta fase englobam: a proliferação dos diferentes tipos de células que constituem o útero, o aumento progressivo do número de recetores de estrogénio e progesterona

nas células uterinas e vaginais, a abertura do cérvix e um aumento da resposta imunitária local (Jeffcoate, 1998).

1.1.2. Estro

O Estro tem a duração aproximada de 12 dias podendo variar de 4 a 24 dias. Em termos comportamentais é caracterizada pela recetividade sexual da cadela. Em termos hormonais observa-se um aumento progressivo da concentração sérica de progesterona, resultante da luteinização precoce das células da granulosa que entram na constituição da parede dos folículos ovários. A combinação da diminuição da concentração de estradiol e do aumento da concentração de progesterona é responsável pelo “*feedback*” positivo ao nível do eixo hipotálamo-hipofisário que resulta na secreção de hormona folículo estimulante (FSH) e, mais importante, de hormona luteinizante (LH) no início do estro (Feldman & Nelson, 2004). O pico de LH corresponde ao início do estro endócrino e tem uma duração de 24 a 96 horas (Concannon, 2010). Cerca de 24-72 horas após o pico de LH, ocorre a ovulação, o que leva a um aumento brusco na concentração sérica de progesterona. Em termos clínicos, esta fase é caracterizada por edema da vulva, crenulação das pregas da mucosa vaginal e o corrimento vulvar sanguíneo pode estar presente ou não. Em termos citológicos observa-se predomínio de células superficiais queratinizadas (Feldman & Nelson, 2004).

1.1.3. Diestro

O diestro é marcado pelo fim do estro e tem uma duração média de 2 meses. A cadela torna-se calma, a atração pelos machos diminui e deixa de estar recetiva. A vulva retorna ao tamanho normal e pode ser observado um corrimento vulvar mucoso (Feldman & Nelson, 2004). Nesta fase a concentração de progesterona continua a aumentar até à 2ª semana, mantendo-se com valores elevados durante mais 2 semanas, e diminuindo gradualmente até atingir valores basais no final do diestro. Durante esta fase, o cérvix encontra-se encerrado, observa-se uma diminuição na imunidade uterina e ocorre o desenvolvimento da glândula mamária (Feldman & Nelson, 2004).

A citologia vaginal de uma cadela nesta fase apresenta diminuição das células superficiais, sendo composta maioritariamente por células intermédias ou parabasais (Feldman & Nelson, 2004).

1.1.4. Anestro

O anestro tem uma duração média de 4 meses, podendo variar entre 1 a 6 meses. Durante esta fase o útero sofre um processo de involução morfológica, principalmente ao nível do endométrio. Em termos hormonais é uma fase de quiescência ovárica, principalmente nos primeiros 3 meses de anestro (Feldman & Nelson, 2004). Na citologia vaginal desta fase são observadas células parabasais e pequenas células intermédias (Feldman & Nelson, 2004).

1.2.Complexo Hiperplasia Quística do endométrio-piometra

A piometra é uma inflamação e infeção no útero com acumulação de pús no lúmen do útero, estando na cadela, normalmente associada a alterações sistémicas. Esta afeção ocorre em cadelas adultas e é mais frequentemente diagnosticada na primeira metade do diestro, altura em que se observam concentrações elevadas de progesterona. A piometra surge frequentemente associada à hiperplasia quística do endométrio (HQE), sendo por isso vulgarmente utilizada a designação de complexo hiperplasia quística do endométrio-piometra (HQE-P). Apesar de poderem surgir associadas, vários estudos defendem que a HQE e piometra são duas entidades distintas podendo desenvolver-se independentemente. Esta conclusão é fundamentada pelo facto da HQE e piometra apresentarem diferenças nas manifestações clínicas e nas alterações histopatológicas e ainda pelo facto de a HQE poder não evoluir para piometra em todas as cadelas. Deste modo, uma elevada percentagem de cadelas desenvolve HQE com a idade e nem todas estas desenvolvem piometra (Pretzer, 2008; Smith, 2006; Facts, 2003). A HQE é uma alteração hormono-dependente, caracterizada por alterações proliferativas e degenerativas do endométrio, não estando associada a doença sistémica (Payan Carreira *et al.*, 2005). No entanto, a HQE é uma condição que pode predispor ao desenvolvimento de piometra. A duração prolongada do diestro e a contaminação por bactérias que ascendem e colonizam o útero durante o proestro e estro, fase em que o

cérvix está aberto, são descritos como sendo dois fatores fulcrais para a ocorrência de piómetra (Payan Carreira *et al.*, 2005).

Segundo Dow o complexo HQE-piómetra pode ser classificado em quatro graus ou estádios. No estádio I, o endométrio aparece espessado com quistos irregulares que variam de tamanho entre os 4 e os 10mm de diâmetro. Histologicamente há aumento das glândulas secretoras do endométrio que desorganizam a estratificação normal. No estádio II, não há grande alteração do diâmetro do útero, mas já se verifica uma infiltração difusa de células inflamatórias localizadas sobretudo no estroma superficial, mas que também se podem estender às criptas, rodear os vasos sanguíneos e estender até à muscular interna. Os sinais clínicos nestes dois primeiros estádios são quase ausentes, podendo observar-se um corrimento vulvar viscoso e pouco intenso. O estádio III é caracterizado por HQE associado a endometrite aguda, o útero apresenta-se aumentado e com conteúdo mucoso, a superfície do endométrio apresenta um aspeto pregueado, com hemorragias focais e áreas de ulceração. Verifica-se nesta fase uma reação inflamatória aguda com congestão, edema e infiltração generalizada de neutrófilos. No estádio IV Dow refere-se a uma HQE associada a um processo endometrite/piómetra crónico. O cérvix pode estar aberto ou fechado. Na forma de piómetra aberta ocorre rutura dos quistos, com saída do conteúdo para o lúmen uterino, observa-se um infiltrado difuso de plasmócitos, neutrófilos e linfócitos no endométrio, que se estende até ao miométrio, pode-se também observar hipertrofia e fibrose do miométrio. Na forma fechada, o miométrio e o endométrio têm uma espessura reduzida. Os sinais clínicos no estádio IV são mais exuberantes, com dilatação do abdómen e existência de um corrimento vulvar de intensidade e cor variável. A sintomatologia dominante é de toxémia, e a intervenção deve ser imediata pois o estado clínico do animal pode deteriorar-se rapidamente devido a choque ou à falência multi-orgânica (Dow, 1959; Hagman *et al.*, 2004; Payan Carreira *et al.*, 2005).

Existem vários fatores de risco associados ao desenvolvimento de piómetra, entre eles a raça, a idade, a paridade e o tratamento com estrogénios ou progestagénios para supressão ou indução do estro, contraceção ou como abortivo (Hagman *et al.*, 2011; Kustritz, 2005; Johnston *et al.*, 2001). As raças referidas como tendo uma maior predisposição para desenvolver piómetra são Golden Retriever, Rough Collie, Rottweiler e Cavalier King Charles Spaniel (Smith, 2006; Kustritz, 2005).

1.2.1. Etiopatogenia

Tal como já foi referido, a HQE é considerada um fator predisponente para o desenvolvimento de piómetra. A HQE é caracterizada por uma modificação histopatológica do útero, com presença de glândulas quísticas no endométrio que variam em tamanho, número e distribuição. O endométrio hiperplásico promove a acumulação de secreções que induzem uma reação inflamatória local e contribuem para o estabelecimento da infeção bacteriana, originando-se desta forma a piómetra (Johnson, 2009). A drenagem do conteúdo glandular para o interior do lúmen uterino, e a acumulação de muco, dada a sua riqueza em mucopolissacarídeos, predispõe à proliferação de microrganismos no útero (Johnson, 2009).

No entanto, vários autores atribuem o desenvolvimento de piómetra à interação de vários fatores etiológicos (Facts, 2003). Estes fatores incluem alterações morfológicas no endométrio, influência hormonal no ambiente uterino, espécie bacteriana e seu grau de virulência, bem como mecanismos individuais de defesa (Holst, 2013; Weiss *et al.*, 2004). A progesterona produzida no diestro é um fator favorável ao estabelecimento das infeções bacterianas no útero, uma vez que esta hormona estimula a atividade secretora das glândulas endometriais, promove o encerramento do cérvix, diminui as contrações do miométrio e diminui a resposta imunitária local (Johnson, 2009).

A contaminação bacteriana do útero ocorre por via ascendente por bactérias que se encontram na vagina, resultantes de contaminação fecal do próprio animal (Facts, 2003). Esta contaminação ocorre na fase de proestro e estro, quando o cérvix se encontra aberto (Johnston *et al.*, 2001). As bactérias isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piómetra incluem: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., e *Proteus* spp (Noakes *et al.*, 2001). Entre estas, *Escherichia coli* (*E. coli*) é a bactéria mais frequentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piómetra, quer isoladamente, quer em associação com outras bactérias. É também à *E. coli* que é atribuída uma maior gravidade dos sinais clínicos (Silva *et al.*, 2010), podendo levar à morte do animal, caso o tratamento não seja instituído rapidamente. A produção de lipopolissacarídeos (LPS) e de vários fatores de virulência que intervêm em diferentes fases da infeção são capazes de induzir uma resposta imunitária por parte do hospedeiro (Mateus *et al.*, 2013). Os isolados de *E. coli* de piómetra pertencem

maioritariamente ao grupo filogenético B2 (Mateus *et al.*, 2013) e apresentam diversos fatores de virulência que estão presentes também nas bactérias uropatogénicas (Chen *et al.*, 2003). A presença de genes que codificam para esses fatores de virulência provavelmente aumentam a virulência e a patogenicidade da estirpe no trato genital canino, facilitando a colonização do endométrio (fímbrias tipo 1, P e S), aumentando a destruição tecidular (α - hemolisina e o fator citotóxico necrosante 1 e 2) e a quantidade de ferro livre disponível necessário ao crescimento bacteriano (α -hemolisina, sideróforos) (Chen *et al.*, 2003; Gyles & Fairbrother, 2010; Mateus *et al.*, 2013).

1.3. Imunidade inata e imunidade adaptativa

A resposta imunitária divide-se em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número limitado de estímulos (Tizard, 2008). É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contacto prévio com agentes imunogénicos ou agressores (Medzhitov & Janeway, 2000). As principais células efectoras da imunidade inata são os macrófagos, os neutrófilos, as células dendríticas e as células *Natural Killer* (NK). A fagocitose, a libertação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema de complemento, bem como a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata (Cruvinel *et al.*, 2010). Estes mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubíqua em microrganismos, mas que não estão presentes na espécie humana. Moléculas, tais como os lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicóicos, que são frequentemente encontradas nas superfícies dos microrganismos, constituem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) e ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes recetores, conhecidos como Recetores de Reconhecimento de Padrões (PRR), de entre os quais a família dos recetores do tipo *Toll* (TLRs - *Toll-Like receptors*) (Kawai, T., & Akira, S. 2011). Os microorganismos podem ser constituídos por diferentes PAMPs, que ativam múltiplos PRRs, assim como diferentes PRRs podem reconhecer o mesmo PAMP. Assim, os TLRs juntamente com outros PRRs, originam uma resposta celular do

hospedeiro específico para combater as infecções (Kawai & Akira, 2011). Desta forma, a ativação da imunidade inata a partir da ligação PRR-PAMP é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adquirida contra antígenos específicos (Arosa *et al.*, 2012). Neste tipo de resposta não há diversidade nem capacidade adaptativa para a formação de novos recetores ou para o reconhecimento de novos padrões moleculares que não aqueles já programados no código genético.

Em oposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (ex.: anticorpos, citocinas e quimiocinas). As principais características da resposta imunitária adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (Cruvinel *et al.*, 2010). Embora as principais células envolvidas na resposta imunitária adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos desempenham um papel fundamental na sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) aos linfócitos T (Delves *et al.*, 2000).

1.3.1. Recetores do tipo *Toll*

Os recetores do tipo *Toll* são moléculas de superfície que desempenham um papel importante no reconhecimento e deteção de agentes patogénicos. Este reconhecimento ativa uma cascata de sinalização que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias (Arosa *et al.*, 2012). Esses recetores estão presentes em diferentes tipos celulares incluindo células de reação inflamatória como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Cruvinel *et al.*, 2010).

Os TLRs são proteínas transmembranares do tipo I em que o domínio extracelular, rico em repetições de leucina, é responsável pelo reconhecimento dos PAMPs e o domínio citoplasmático (*receptor Toll-IL-1*) é responsável pela ativação da cascata de sinalização intracelular. Até à data, foram identificados 10 TLRs funcionais em humanos e 12 em ratos. Estes TLRs podem ser subdivididos de acordo com a sua localização celular e com os PAMPs que reconhecem. Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados à superfície da membrana celular das células e

reconhecem uma grande variedade de componentes que constituem a parede dos microrganismos, enquanto os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, estão localizados em vesículas intracelulares, como as do retículo endoplasmático (RE), endossomas, lisossomas e endolisossomas, onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos (Ishii, 2008). Uma vez ativados, os TLRs recrutam um conjunto específico de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR (domínio homólogo ao recetor Toll/Interleucina-1), como o fator MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88), TIRAP ou MAL (*TIR-domain-containing adaptor protein*), TRIF (proteína adaptadora que contém o domínio TIR capaz de induzir Interferão β , IFN- β) ou TRAM, também conhecido por TICAM2 (molécula adaptadora de TRIF) e iniciam uma cascata de sinalização que leva à síntese de citocinas inflamatórias, Interferão tipo I (IFN-I), quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (Kawai & Akira 2010). Esta resposta vai originar o recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e a indução de genes estimuladores de IFN, resultando na morte dos microorganismos.

À exceção do TLR3, a via de sinalização dependente da proteína adaptadora MyD88 é utilizada por todos os TLRs para ativação dos fatores de transcrição NF κ B (fator nuclear-kappa B) ou da família IRF (fator de regulação do interferão) e consequente indução da produção de citocinas. Na via independente de MyD88 mediada pelo TLR3 e TLR4, a ativação do NF κ B e IRF-3 (fator regulador do interferão 3) é conseguida através de outra molécula adaptadora, o TRIF, o que induz a produção de IFN-I e de citocinas. Na via dependente de MyD88, o TLR2 e TLR4 usam a proteína MAL (ou TIRAP) como adaptador adicional para recrutar MyD88. Na via independente de MyD88, TRAM atua como uma ponte entre TLR4 e TRIF (Kawai & Akira, 2011).

O TLR4 é o único TLR que recruta quatro adaptadores e ativa as duas vias de sinalização, MyD88 dependente e independente (Kawai & Akira, 2010). Estas duas vias têm cinéticas diferentes (Figura 2). Na via de sinalização dependente de MyD88, o TLR4 recruta o adaptador MyD88 e ativa as proteínas IRAK-1 (recetor de interleucina associado a cinase 1) e IRAK-4 (recetor de interleucina associado a cinase 4). Em associação com o TRAF6 [fator 6 associado ao recetor de TNF- α (fator de necrose tumoral- α)], os IRAKs ativam TAK1 [(cinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformador β (TGF- β)], que por sua vez fosforila um complexo de cinases de I κ B, chamado de IKK, que é formado por 2 subunidades, a IKK α e a IKK β , culminando com a ativação de NF κ B e de proteínas cinases ativadas por

mitógenos (MAPKs) (Kawai & Akira, 2010). Na via independente de MyD88, o TLR4 sofre endocitose e é entregue a vesículas intracelulares, pequenas GTPases Rab11a-positivas, para formar o complexo com TRAM e TRIF, que vão recrutar TRAF3 (fator 3 associado ao recetor do TNF) e as proteínas cinases TBK1 (*Tank-binding kinase 1*) e IKKi [*inhibitor of NFkB (IkB) kinase*], que catalisam a fosforilação de IRF-3, levando a expressão de IFN-I. Adicionalmente, o complexo TRAM-TRIF também recruta TRAF6 e TAK1 (*TGF-β-activated kinase 1*) como mediadores da ativação tardia de NFkB e de cinases MAP (proteínas ativadas por mitógenos) (Kawai & Akira, 2010). Enquanto a ativação da via dependente do TRIF é suficiente para a indução de IFN-I, é necessária a ativação tanto da via dependente de MyD88 como da dependente de TRIF para gerar uma ativação robusta do NFkB e da cinase MAP, com subsequente indução das citocinas inflamatórias (Kawai, & Akira, 2011).

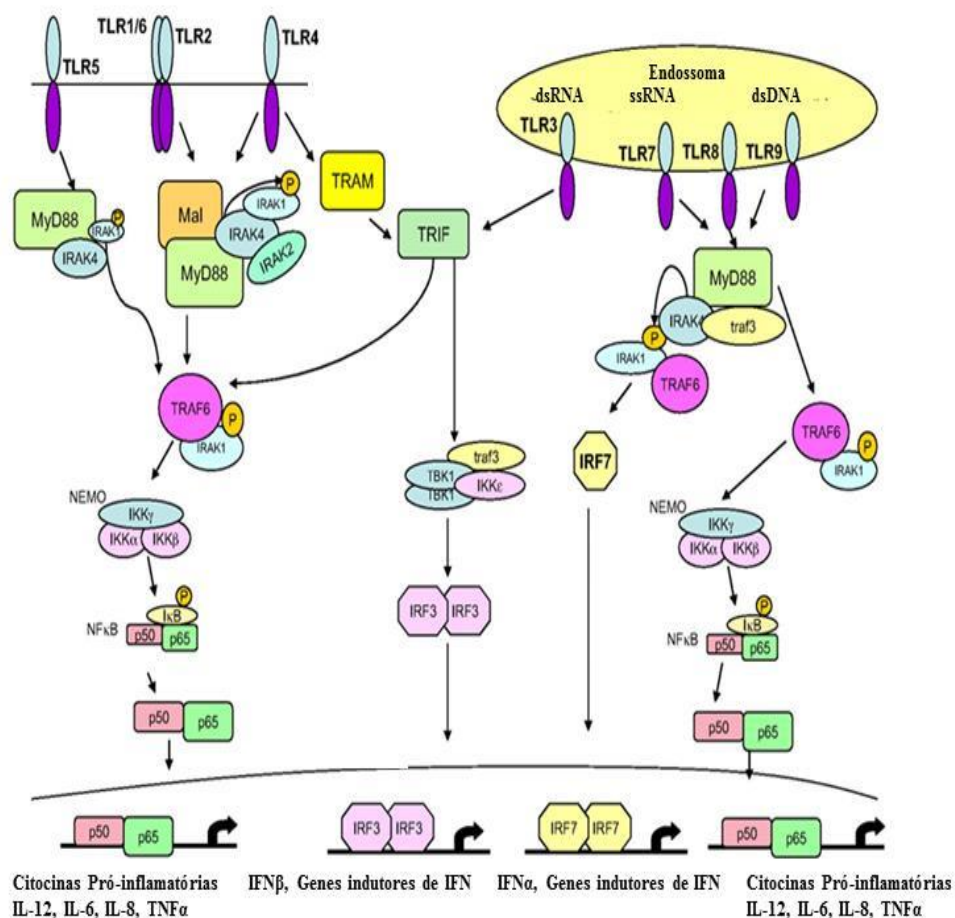


Figura 2- Vias de sinalização dos receptores do tipo *Toll* (Adaptado de O'Neill *et al.*, 2009).

1.3.2. Detecção de PAMPs bacterianos pelos TLRs

Os componentes da parede celular bacteriana são amplamente reconhecidos pelos TLRs presentes na superfície celular, enquanto os ácidos nucleicos são reconhecidos pelos TLRs intracelulares (Kawai & Akira, 2011). O lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular das bactérias Gram negativas é reconhecido pelo TLR4 (Akira *et al.*, 2006). O TLR2 reconhece uma grande variedade de PAMPs das bactérias Gram positivas e Gram negativas, como é o caso das lipoproteínas e peptidoglicanos, que estão presentes em ambos os tipos de bactérias, e o ácido lipoteicóico (LTA) presente nas bactérias Gram positivas (Akira *et al.*, 2006). Dependendo das diferentes estruturas PAMP a reconhecer, o TLR2 forma heterodímeros com o TLR1, com o TLR6, ou com outras moléculas de superfície como a Dectina-1 e o CD36 (Akira *et al.*, 2006). O heterodímero TLR2-TLR1 reconhece os lipopéptidos triacilados das bactérias Gram negativas, enquanto o heterodímero TLR2-TLR6 reconhece os lipopéptidos diacilados das bactérias Gram positivas. O *DNA* (Ácido desoxiribonucleico) genómico das bactérias é reconhecido pelo TLR9 (Haas *et al.*, 2008). O *RNA* (Ácido ribonucleico) bacteriano também possui capacidade de estimulação do sistema imunitário (Haas *et al.*, 2008).

1.3.3. Recetores do tipo *Toll* no útero da cadela

A transcrição dos TLRs 1 a 7 e 9 foi detetada no endométrio de cadelas em diferentes fases do ciclo éstrico. Esta observação indica que o endométrio da cadela é capaz de reconhecer uma grande variedade de PAMPs e de orquestrar uma resposta imune inata contra vírus e bactérias. No entanto, consoante a fase do ciclo éstrico, a transcrição dos TLR2 e TLR4 é diferenciada, encontrando-se diminuída no endométrio no início de diestro (ID). Este facto, parece justificar a maior susceptibilidade do útero à infeção nesta fase (Silva *et al.*, 2012)., Vários autores demonstraram que a transcrição e a expressão de TLR2 e de TLR4, está aumentada em endométrios de cadelas com piómetra por *E. coli*, possivelmente devido a ação do LPS e das lipoproteínas presentes na parede celular desta bactéria (Akira *et al.*, 2006; Silva *et al.* 2010, 2012; Zähringer *et al.*, 2008). A sobre-expressão destes genes nos casos de piómetra reflete provavelmente o aumento e infiltração de células de reação inflamatória, nomeadamente neutrófilos, no endométrio como resposta a infeção (Silva *et al.*, 2010).

1.3.4. Citocinas

As células responsáveis pela resposta imunitária são: os linfócitos B, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células endoteliais e os mastócitos (Jason *et al.*, 2001). Estas células desempenham papéis distintos no sistema imunitário e comunicam com outras células através de citocinas, que controlam a proliferação, diferenciação e função das células do sistema imunitário. Ao contrário do que acontece com as hormonas as citocinas não são armazenadas em glândulas como moléculas pré-formadas, mas são rapidamente produzidas por diferentes células após estimulação. São moléculas pleiotrópicas, ou seja podem ter várias ações em contextos biológicos diferentes, têm também um papel central na resposta imunológica, na hematopoiese, na neurogénese, na embriogénese e na oncogénese. Afetam frequentemente a ação de outras citocinas de uma forma sinérgica ou antagónica (Heinrich *et al.*, 1998).

As citocinas ligam-se a recetores específicos nas membranas das células, gerando uma sinalização intracelular, que leva à alteração na expressão génica. A suscetibilidade de uma célula a determinada citocina é mediada pela presença desses recetores de superfície. As citocinas podem ligar-se a recetores existentes na mesma célula que a produziu, exercendo uma ação autócrina; a recetores de uma célula próxima exercendo uma ação parácrina, ou ainda poderão exercer uma ação endócrina, quando se ligam a recetores de células presentes em regiões distantes.

Com base na resposta biológica, as citocinas têm sido classificadas em pró e anti-inflamatórias (Heinrich *et al.*, 1998) (Tabela 1).

Em úteros de cadelas com piómetra, a tecnologia de microarrays, permitiu demonstrar alterações na expressão de 800 genes, muitos deles associados a citocinas, a quimiocinas, à extravasão de células inflamatórias, à ação antibacteriana, ao sistema de complemento e à resposta imune inata (Hagman *et al.*, 2009). Um dado importante encontrado neste estudo foi a sobre-expressão de um grande painel de proteases, incluindo as metaloproteinases (Hagman *et al.*, 2009). Em 90% de cadelas com piómetra observou-se um aumento das concentrações séricas TNF- α , IL-7, IL-15, IL-18 e IL-8. No entanto, somente 3% apresentaram concentrações séricas elevadas de IL-4, IL-6 e IFN- γ (Karlsson *et al.*, 2012).

Tabela 1- Principais citocinas associadas à resposta inflamatória (Adaptado de Arosa *et al.*, 2012)

Citocinas	Células produtoras	Principais ações
Fator de necrose tumoral (TNF)	Macrófagos, células Th1 e neutrófilos	Agente antitumoral Ativação de neutrófilos, linfócitos e macrófagos
Interleucina 1 (IL-1)	Macrófagos, PMN (Polimorfonucleares) e células epiteliais	Ação principalmente pro-inflamatória Indução de proteínas de fase aguda Ação quimiotática e de ativação de PMNs Diferenciação de células Th17
Interleucina 2 (IL-2)	Células T CD4, células T CD8 ativadas, células dendríticas, células NK e células NKT	Proliferação de células T e B efectoras Desenvolvimento de células Treg Diferenciação e proliferação das células NK Fator de crescimento para células B
Interleucina 4 (IL-4)	Células Th2, basófilos, eosinófilos, mastócitos e células NKT	Indução da diferenciação de Th2 Regulação positiva da expressão MHC classe II em células B Regulação positiva de CD23 e IL-4R Fator de sobrevivência para células B e T Papel na adesão e inflamação Defesa contra parasitas Diminuição da expressão de IL-1 e IL-6
Interleucina 6 (IL-6)	Células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos	Ação principalmente pro-inflamatória Indução de proteínas de fase aguda Regulação negativa de produção de IL-1 e TNF, ativação de PMNs e células Th17

Tabela 1- Principais citocinas associadas à resposta inflamatória (continuação)

Citocinas	Células produtoras	Principais ações
Interleucina 8 (IL-8)	Macrófagos e células endoteliais	Agente quimiotático para os neutrófilos Promove adesão dos neutrófilos às células endoteliais Desgranulação dos neutrófilos
Interleucina 10 (IL-10)	Células Treg, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células NKT, eosinófilos, mastócitos e células dendríticas	Ação anti- inflamatória e de imunossupressão Diminuição da expressão das moléculas MHC classe II nas células apresentadoras de antígeno Bloqueio da síntese de citocinas pró-inflamatórias
Interferão-γ (IFN-γ)	Células epiteliais macrófagos, células dendríticas, células NK, células T e B e células Th1	Propriedades antivirais e citotóxicas Estimulação da diferenciação Th1 Regulação positiva da expressão MHC de classe I e II Regulação da interação leucócitos/endotélio Ativação de macrófagos Indução de produção de IL-1, monóxido de azoto e produção de radicais de O ₂
Transforming Growth Factor- β (TGF-β)	Macrófagos, linfócitos e fibroblastos	Inibição ou promoção do crescimento tumoral Indução da síntese de proteínas da matriz extracelular e da cicatrização Supressão de proliferação e diferenciação de linfócitos T e B Regulação negativa de produção de IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ Bloqueio da produção de monóxido de azoto pelos macrófagos Inibição da proliferação de células Th17 e indução da proliferação de células Treg

1.3.5. Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMPs) compreendem um grupo de mais de 20 endopeptidases zinco- dependentes, classificadas de acordo com a sua afinidade para um determinado substrato. Uma das funções das MMPs é a degradação de componentes da matriz extracelular numa variedade de processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, a remodelação e a reparação tecidual. Esta degradação é uma parte essencial do crescimento, invasão e metastização de tumores malignos (Ala-aho & Kähäri, 2005). Uma grande variedade de células expressam MMPs, entre elas as células inflamatórias: macrófagos, mastócitos e polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos e células T, em resposta às citocinas (DeClerck, 2000; Szabo *et al*, 2004).

A collagenase intersticial, também designada de MMP-1, é expressa por células como os queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos, e é responsável pela iniciação da degradação do colagénio tipo I, II, III e VII (KerKelä & Saarialho-Kere, 2003). A MMP-9, também designada por gelatinase B, é uma proteína com 92 kDa e é expressa, em tecidos humanos, pelos leucócitos, monócitos e macrófagos e também pelos queratinócitos (KerKelä & Saarialho-Kere, 2003). No estudo de Hagman *et al*. (2009) identificou-se uma sobre-expressão das MMP-1, MMP-7, MMP-9 e MMP-13 que poderá estar ligado à destruição tecidual observada nos úteros com piómetra.

1.4. Objetivos

Com o intuito de caracterizar a resposta inflamatória no endométrio da cadela com diagnóstico de piómetra por *E. coli*, estabeleceu-se como objetivos deste trabalho:

- 1- Localização e avaliação semi-quantitativa das células de reação inflamatória (células de origem mielóide, linfócitos B e T), no útero de cadelas em diestro com piómetra e sem afeção uterina.
- 2- Identificação da transcrição de genes que codificam para componentes das vias de sinalização dos TLRs (via de sinalização dependente e independente da proteína adaptadora MyD88) no endométrio de cadelas que desenvolveram piómetra e de cadelas em diestro sem afeção uterina.
- 3- Comparação dos níveis de mRNA de componentes das vias de sinalização dos TLRs (MyD88-dependente e independente) produzidos no endométrio de cadelas que desenvolveram piómetra e de cadelas em diestro sem afeção uterina.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras

Na elaboração deste trabalho, foram utilizados 19 úteros de cadelas com piómetra e 10 úteros de cadelas em diestro sem infecção uterina, que foram submetidas a ovariectomia (OVH), no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. As cadelas com piómetra utilizadas neste estudo tinham idades compreendidas entre 4 e 13 anos (média de 9,7 anos) e sem piómetra 1 e 11 anos (média 3 anos). O diagnóstico de piómetra foi efetuado com base na fase do ciclo éstrico em que a cadela se encontrava (diestro), nos sinais clínicos e nos resultados hematológicos e ecográficos. No conteúdo intra-uterino recolhido após OVH, somente foi isolada *E. coli*. As cadelas em diestro normal foram submetidas a OVH eletiva, por motivos de contraceção. Após OVH, foi colhida uma zaragatoa intra-uterina, tendo o resultado bacteriológico sido negativo.

A colheita e acondicionamento das amostras foi efetuada de acordo com o protocolo utilizado pela seção de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária. Imediatamente após a OVH, com auxílio de material cirúrgico estéril foram retiradas amostras de cada corno uterino para utilização em imunohistoquímica e para a extração de RNA. Os tecidos uterinos para imunohistoquímica foram fixados em formol tamponado (Formaldeído 4% pH6.9, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) durante 24h, processados num processador de tecidos LEICA TP 1020 e incluídos em parafina. Para a extração de RNA foram utilizadas amostras de endométrio, o qual, depois de separado das restantes camadas do útero, foi lavado com tampão fosfato salino (PBS; pH entre 7,2 e 7,4) RNase-free estéril e colocado em criotubos, congelado em azoto líquido e armazenado a -80°C até posterior utilização.

2.2. Caracterização histopatológica das amostras

Para avaliação e caracterização histopatológica os fragmentos uterinos foram seccionados no micrómetro (LEICA SM 2000R) de forma a obter cortes de 3µm de espessura, os quais foram posteriormente submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) (Hematoxylin Solution Gill N°2, Accustain®, GHS280, Sigma-Aldrich,

St Louis, EUA; Eosin Y Solution Alcoholic with Phloxine, Accustain®, HT110380, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Este processamento foi efetuado no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-UL).

2.3. Imunolocalização de células de reação inflamatória no útero de cadelas

A técnica de imunohistoquímica foi efetuada em cortes histológicos de úteros de cadelas com piómetra e de úteros sem afeção de cadelas em diestro (amostras controlo). Para tal, utilizaram-se secções de tecido com espessura de 3µm aderentes em lâminas *SUPERFROST® PLUS* (*Thermo scientific*, EUA). Para uma completa aderência dos cortes às lâminas, estas foram colocadas na estufa a 62°C, durante 1 hora e de seguida a 37°C durante a noite.

Os cortes de parafina foram desparafinados em xilol e a hidratação foi efetuada através da incubação das lâminas numa série de álcoois de concentração decrescente, finalizando com a imersão em água destilada durante 5 minutos. Com exceção do anticorpo anti-CD3, depois da desparafinação e hidratação, o procedimento para a imunolocalização foi efetuado com recurso ao *kit* comercial *NovoLink™ Polymer Detection Systems* (Novocastra™, Alemanha) e de acordo com as instruções do fabricante. A recuperação antigénica foi efetuada em tampão tris-EDTA pH 9,0 (Novocastra™, Alemanha), em microondas, durante 5 minutos a 900W seguidos de 15 minutos a 600W, e de um arrefecimento gradual durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Após o arrefecimento completo das lâminas, fizeram-se duas lavagens em PBS. As secções foram posteriormente incubadas com a solução de bloqueio de proteínas (*Protein Block Solution* - Kit NovoLink™), durante 15 minutos, que tem como finalidade bloquear os locais de ligação inespecífica. A incubação com os anticorpos primários, diluídos de acordo com a Tabela 2, em tampão de diluição (IHC Diluent, Novocastra™, Alemanha), foi efetuada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação com os referidos anticorpos procedeu-se a duas lavagens de 5 minutos cada em PBS. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação numa solução de bloqueio (*Peroxidase Block-Kit NovoLink™*), durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos com a solução Post Primary

Block (Kit NovoLink™), que tem como função ativar a penetração do polímero, e em seguida lavadas em PBS e incubadas por mais 30 minutos com a solução NovoLink Polymer (Kit NovoLink™). Após mais duas lavagens de 5 minutos com PBS, foi feita a revelação através da atividade da peroxidase sobre a solução cromogénica de DAB (Diaminobenzidina-Kit NovoLink™), durante 5 minutos. Por último, após lavagem em água corrente, foi utilizado o corante *Hematoxilina de Mayer* (Mayer's hemalum solution, Merck, Alemanha). As lâminas foram novamente imersas em água destilada seguida de água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas com o meio de montagem *Quick-D mounting media* (Klinipath, Bélgica).

Para o anticorpo anti-CD3, o protocolo de imunohistoquímica foi efetuado, sem recurso ao *Kit* comercial. Depois da desparafinação e hidratação, procedeu-se ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena através da imersão das lâminas numa solução de peróxido de hidrogénio a 3% em água destilada, durante 30 minutos à temperatura ambiente. A recuperação antigénica foi efetuada em tampão Tris-EDTA pH 9,0 (Novocastra™, Alemanha), como anteriormente descrito. De seguida, de forma a bloquear os locais de ligação inespecíficos, as lâminas foram incubadas numa solução de bloqueio (PBS+0,1% Tween+5% soro de cabra+2,5% BSA-Albumina bovina sérica), durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário durante 2 horas, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário usado foi produzido em cabra contra IgG de coelho e conjugado com peroxidase (*peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG polyclonal*; Dako, Dinamarca) na diluição de 1:100, durante 1 hora e à temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi desencadeada pela adição de DAB (DAB kit, Zytomed Systems, 00-2014, Berlim, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante. A coloração com Hematoxilina e a montagem das lâminas foi feita como acima descrito.

Em todos os ensaios de imunohistoquímica foi colocada uma lâmina de controlo negativo em que o anticorpo primário foi substituído pelo mesmo volume de PBS e outra lâmina com o IgG. Como controlo positivo para a marcação de linfócitos B, T e de células de origem mielóide (granulócitos e macrófagos), foram utilizados cortes de tonsila de cão.

Tabela 2- Anticorpos utilizados na realização da técnica de imunohistoquímica para identificação das células de reação inflamatória nas amostras em estudo.

Anticorpo		Diluição	Células a identificar	Tipo de marcação
CD3, DAKO	<i>Polyclonal rabbit anti-human</i>	1:200	Linfócitos T	Membranar e/ou citoplasmática
CD79 α cy, clone HM57, DAKO	<i>Monoclonal mouse anti-human</i>	1:150	Linfócitos B (pré-B até plasmócitos)	Membranar e/ou citoplasmática
PAX5, clone 1EW, LEICA	<i>Monoclonal mouse anti-human</i>	1:100	Linfócitos B (pró-B, pré-B, B maduras e imunoblastos)	Nuclear
MAC 387, Myeloid/Histiocyte antigen, DAKO	<i>Monoclonal mouse anti-human</i>	1:400	Granulócitos, monócitos e macrófagos	Citoplasmática

2.4. Análise semi-quantitativa das marcações das células de reação inflamatória

As marcações com os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α cy, anti-PAX5 e anti-calprotectina-MAC 387 foram quantificadas manualmente em duas áreas do útero, o estroma e as glândulas endometriais. A classificação da marcação foi efetuada com base na percentagem do tipo de células de reação inflamatória para cada amostra. Esta classificação compreendeu três níveis de marcação: 0= ausência de marcação; 1= fraca (< 10 células positivas por campo); 2= moderada (10-30 células positivas por campo) e 3= intensa (> 30 células positivas por campo). A classificação atribuída

a cada seção de tecido foi calculada de acordo com a média das contagens efetuadas em cinco campos em ampliação de 400x, selecionados de forma aleatória. Esta análise foi efetuada em todas as seções em estudo (2-3 por cada útero), por dois observadores independentes e utilizando um microscópio (Olympus, BX51) equipado com uma câmara digital (Olympus, DP21).

2.5. Avaliação da transcrição por transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Com o objetivo de verificar se os genes em estudo são transcritos no endométrio de cadelas com piómetra, por comparação com o endométrio de cadelas sem afeção uterina, procedeu-se à amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase) de sequências dos respetivos transcritos a partir de amostras de cDNA (DNA complementar). Para tal, foram utilizadas amostras de útero de cadelas diagnosticadas com piómetra (n=19) e de cadelas sem afeção uterina, sujeitas a OVH (n=10). Esta análise foi efetuada para componentes chave das duas vias de sinalização dos TLR (recetores do tipo *Toll- Toll like receptors*) (via dependente e independente da proteína adaptadora MyD88) e para genes que codificam para proteínas relacionadas com a inflamação.

2.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA total foram processados cerca de 30mg de tecido utilizando o *kit* Rneasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). A digestão do DNA genómico foi realizada com o *kit* Rnase-free Dnase Set (Promega, Wood Hollow road, Madison, USA). De forma a determinar a qualidade e a concentração do RNA extraído efetuaram-se leituras espectrofotométricas a 260 e a 280nm no equipamento NanoDrop2000C Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A integridade do RNA extraído foi ainda verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com brometo de etídio.

A síntese de cDNA foi efetuada a partir de 500ng do RNA total utilizando o *kit* comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR

(Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi depois diluído (1:10) em água RNase-free, aliquotado e armazenado a -20°C até posterior utilização.

2.5.2. PCR convencional

Para a construção dos oligonucleótidos iniciadores usou-se o programa *Primer3 Software*. De forma a evitar a amplificação de DNA genómico, o par de oligonucleotídeos foram desenhados em exões distintos adjacentes. A especificidade dos oligonucleótidos iniciadores selecionados foi confirmada por BLAST. Os oligonucleótidos usados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 3.

As reações individuais de PCR foram efetuadas num volume final de 25µL, contendo 0,4µM de cada oligonucleótido iniciador (Tabela 3), 0,4mM da mistura de dNTPs (Promega), 1X tampão da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 2 mM MgCl₂ (Promega), 1-2µL de cDNA e 2,5U da enzima Taq DNA polimerase (*GoTaq® Flexi DNA Polymerase*, Promega). Em cada ensaio foi incluído um controlo negativo, ao qual se adicionou água em vez de cDNA. As condições do ciclo de amplificação foram idênticas para todos os pares de oligonucleótidos iniciadores utilizados, exceto para a temperatura de *hibridação*. O ciclo de amplificação foi composto por: um passo inicial de desnaturação de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (entre 52,5 e 60°C; 1 minuto) e extensão (3 minutos a 62°C); e um passo final de extensão de 7 minutos a 72°C depois de completados os 30 ciclos. Após a amplificação no termociclador (BIORAD, *mj mini personal thermal cycler*), os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (géis de concentração de 1%, 1,5% ou 2%) e observados no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech). O peso molecular dos produtos obtidos foi comparado com as bandas de um marcador de pesos moleculares (HyperLadder II – Bioline).

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores usados nas diferentes reações de PCR convencional

Gene	Nº de acesso (Genebank)	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5`-3`)	Temperatura de Hibridação	Tamanho do produto de PCR (bp)
MyD88	XM_534223	FW- ACTATCGGCTGAAGTTGTGTGTGT RV- TGGTGTAGTCACAGACAGTGATGAA	58,3	276
TRAM	NM_001204337	FW- GGGTGTCTCAGGAAGTCGAAAATA RV- CTGCGTGCAGTATCACAAACTT	56,8	266
TRAF6	XM_003432322	FW- AAAGTGTGAAAACAGCTGTGGA RV- CAGTTCATGCAAGAAACCTGTC	56,1	564
TRIF	XM_849573	FW- CTTCCAAAGCCCATAGAGGA RV- AAGCGGTGTCTTCTACAGGAA	55,4	487
IRF-3	XM_005616307	FW- GGTGCCTACACTCCTGGAAA RV- CTTCATCAGGCACCAAGAGC	56	418
NF-kB	NM_001003344	FW- TGTTTCACTTGGATCCTTTGAC RV- AGATCCCATCCTCACAGTGTTT	55,4	327
IL-1 β	NM_001037971	FW- CACCAGTGAAATGATGGCTTAC RV- CTCATGTGGAACACCACTTGTT	56	453
IL-2	NM_001003305	FW- TTGTCGAAACAGTGCACCTA RV- CCTGGAGAGTTGGGGGTTCT	60	131
IL-4	NM_001003159	FW- CTCACCAGCACCTTTGTCCA RV- GTCAGCTCCATGCACGAGTC	60	107

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores usados nas diferentes reações de PCR convencional (continuação)

Gene	Nº de acesso (Genebank)	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5`-3`)	Temperatura de Hibridação	Tamanho do produto de PCR (bp)
IL-6	NM_001003301	FW- GTACATCCTCGGCAAAATCTCT RV- GGATGAGGTGAATTGTTGTGTG	56	410
IL-8	NM_001003200	FW- TTGGCAGCTTTTGTCTT RV- GGGCCACTGTCAATCACT	52,5	149
IL-10	NM_001003077	FW- AAGCTGGACAACATACTGCTGA RV- TGTCAAACCTCACTCATGGCTTT	56	316
TNF- α	NM_001003244	FW- TGACAAGCCAGTAGCTCATGTT RV- CGGCAAAGTCCAGATAGTTAGG	56,3	410
IFN- β	NM_001135787	FW- CAGTAGATGCATCCTCCAAACA RV- GACTATTGTCCAGGCACAGATG	55,9	493
IFN- γ	NM_001003174	FW- GCTGTAACTGTCAGGCCATGTTT RV- TGTTTTGTCACTCTCCTCTCTCCA	60	140

2.6. Quantificação da expressão de mRNA por PCR em tempo real

Neste estudo foi ainda quantificado o nível da transcrição de genes envolvidos nas vias de sinalização dos TLRs. Para tal, o método utilizado foi o de quantificação relativa por PCR em tempo real: avaliou-se o nível de expressão de mRNA nas amostras de piómetra por comparação com as amostras de diestro sem afeção uterina.

As sequências de oligonucleótidos foram desenhadas com base nas sequências dos mRNAs depositadas no NCBI (*National center for biotechnology information*) (Tabela 4). Para o desenho dos oligonucleótidos iniciadores usou-se inicialmente o programa Primer 3 e as sequências selecionadas desta forma foram depois confirmadas no programa específico para escolha de oligonucleótidos iniciadores para real time, o Primer Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). De forma a evitar a amplificação de DNA genómico, o par de oligonucleótidos para amplificação de um determinado transcrito foi desenhado em exões distintos adjacentes. A identidade de cada uma das sequências de oligonucleótidos foi confirmada por BLAST.

As reações de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicado em placas de 96 poços (Applied Biosystems, Warrington, UK), sendo que cada reação foi preparada num volume final de 12,5 µL contendo 80 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 6,25 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e 1 µL de cDNA (diluído de 1:10). As placas foram depois corridas no aparelho de real time StepOnePlus™ versão 2.2 (Applied Biosystems, Warrington, UK) usando o ciclo universal de amplificação sugerido pelo fabricante. As curvas de dissociação foram adquiridas e analisadas de forma a confirmar a amplificação de um produto único, com a temperatura *de melting* (T_m) esperada. A transcrição do controlo endógeno, gene *RPL27*, foi avaliada em todas as placas juntamente com os genes alvos. Os resultados do PCR em tempo real foram analisados pelo *software PCR real time Miner*, disponível *on-line* (<http://www.miner.ewindup.info/>; Zhao and Fernald, 2005; Silva *et al.*, 2009), e em que se usou o controlo endógeno para normalização dos resultados de expressão de mRNA de cada gene alvo.

Tabela 4- Oligonucleótidos iniciadores usados nas reações de PCR em Tempo real

Gene	Nº de acesso (Genebank)	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto de PCR (bp)
TLR4	NM_001002950	FW- CCTCTTGTCATTGGATACACTAGCTT RV-TGCTGTTGTCCTTGTTTCCTTGA	105
TLR2	NM_001005264	FW- CACTTCAATCCCCCGTTCAA RV- AATAATCCACTTGCCGGAATA	66
CD14	XM_843653	FW- TTAGGTGCAACAAGCTGAACAGAG RV- GTCGTCGGGTTTTCTTGGTACTT	124
IL-1 β	NM_001037971	FW- GAAGAAGCCCTGCCCACA RV- AATTATCCGCATCTGTTTTGCAG	104
IL-6	NM_001003301	FW- CTGGCAGGAGATTCCAAGGAT RV- TCTGCCAGTGCCTCTTTGC	167
IL-8	NM_001003200	FW- TTGCTCTCTTGGCAGCTTTTG RV- TTTGGGATGGAAAGGTGTGG	122
IL-10	NM_001003077	FW- ACATCAAGAACCACGTGAACTCC RV- ACTCACTCATGGCTTTGTAGACACC	177
TGF- β 1	NM_001003309	FW- AGCCCGAGGCGGACTACTAC RV- CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA	130
MMP1	XM_546546	FW- TACATGCGCGTAAATCCCTTCT RV- TAGCACATCCTGACCCTGAACA	168
MMP9	NM_001003219	FW- TTCGACGACGAGGAGTTATGG RV- TCGAAGGTGAAGGGGAAGTG	101
RPL27	NM_001003102	FW- TCGTCAACAAGGATGTCTTCAGAG RV- TCTTGCCAGTCTTGACCTCTCCT	96

2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados recorrendo ao programa *STATISTICA for Windows*, (Statistica 5.0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA, 1995) utilizando o teste *Mann-Whitney*. O nível de significância escolhido foi de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Avaliação histopatológica do útero de cadelas diagnosticadas com piómetra

Neste estudo foi efetuada a análise histológica de 19 úteros de cadelas que desenvolveram piómetra e de 10 úteros sem afeção uterina. De forma a aumentar a robustez da análise, para cada útero foram avaliadas 2-3 porções diferentes, tendo sido analisados um total de 51 cortes histológicos. Esta caracterização teve como objetivo avaliar a integridade morfológica do útero bem como identificar nas amostras em estudo características histopatológicas associadas à piómetra. Para tal, foram avaliados os seguintes parâmetros: integridade da parede do útero em geral, destruição do epitélio luminal, presença de edema, hemorragia, infiltração de células de reação inflamatória, glândulas quísticas com ou sem infiltrado inflamatório e presença de abscessos (Tabela 5). A observação histológica dos úteros sem afeção de cadelas em diestro foi efetuada para confirmar que estes úteros não apresentavam alterações podendo ser utilizados como controlo.

Todos os casos de piómetra analisados tinham hiperplasia quística do endométrio associado, correspondendo a piómetras no estadio III e IV da classificação de Dow. Em relação às alterações histológicas do tecido, verificou-se uma perda de integridade da parede do útero em cerca de 84,2% dos casos e destruição do epitélio luminal em 100% (Tabela 5). Nestas amostras foi possível identificar um grande número de capilares o que está associado à reação inflamatória, particularmente a hiperémia. Em 68,4% dos úteros analisados observou-se ainda focos de hemorragia, característica esta associada ao aumento da permeabilidade dos vasos e à sua rotura (Figura 3-D). Em mais de metade dos úteros (63,2%) foi também identificado sinais de edema (Figura 3-C). Relativamente à presença de células de reação inflamatória, em todas as amostras de piómetra foi observado exsudado inflamatório, nomeadamente neutrófilos, embora apenas em cerca de metade destas a infiltração se estendesse ao miométrio (Figura 3-F). A presença de abscessos foi também uma característica detetada em cerca de metade dos casos de piómetra (Tabela 5). Por outro lado, em todos os casos foi observado dilatação das glândulas endometriais que se apresentaram com um aspeto quístico e, na maioria dos casos, com numerosos neutrófilos no lúmen da glândula (Tabela 5; Figura 4-G). No que se refere à análise

do epitélio glandular, as glândulas basais quísticas apresentavam epitélio pavimentoso e as apicais mantinham o epitélio cilíndrico de revestimento com características secretoras. Em cerca de 100% e 68,4% dos casos foi ainda observada destruição das glândulas apicais e basais, respetivamente (Tabela 5; Figura 4-L e 4-J).

À exceção da presença de células de reação inflamatória em número reduzido, associadas à fase de diestro, todos os parâmetros analisados não apresentaram alterações ou estavam ausentes nos úteros sem alteração patológica de cadelas em diestro utilizados no estudo.

Tabela 5- Caracterização histopatológica (coloração HE) de úteros de cadela com piómetra (n=19)

Alterações histopatológicas	
Útero	(%) de casos de piómetra
Critérios de avaliação	
Destruição geral do tecido	84,2
Destruição do epitélio luminal	100
Edema	63,2
Hemorragia	68,4
Células de reação inflamatória	100
Extensão ao miométrio do infiltrado inflamatório	52,6
Glândulas quísticas com neutrófilos no lúmen	94,7
Abcessos	47,4
Glândulas	(%) de casos de piómetra
Critérios de avaliação	
Dilatação das glândulas basais	100
Destruição das glândulas basais	68,4
Dilatação das glândulas apicais	100
Destruição das glândulas apicais	100

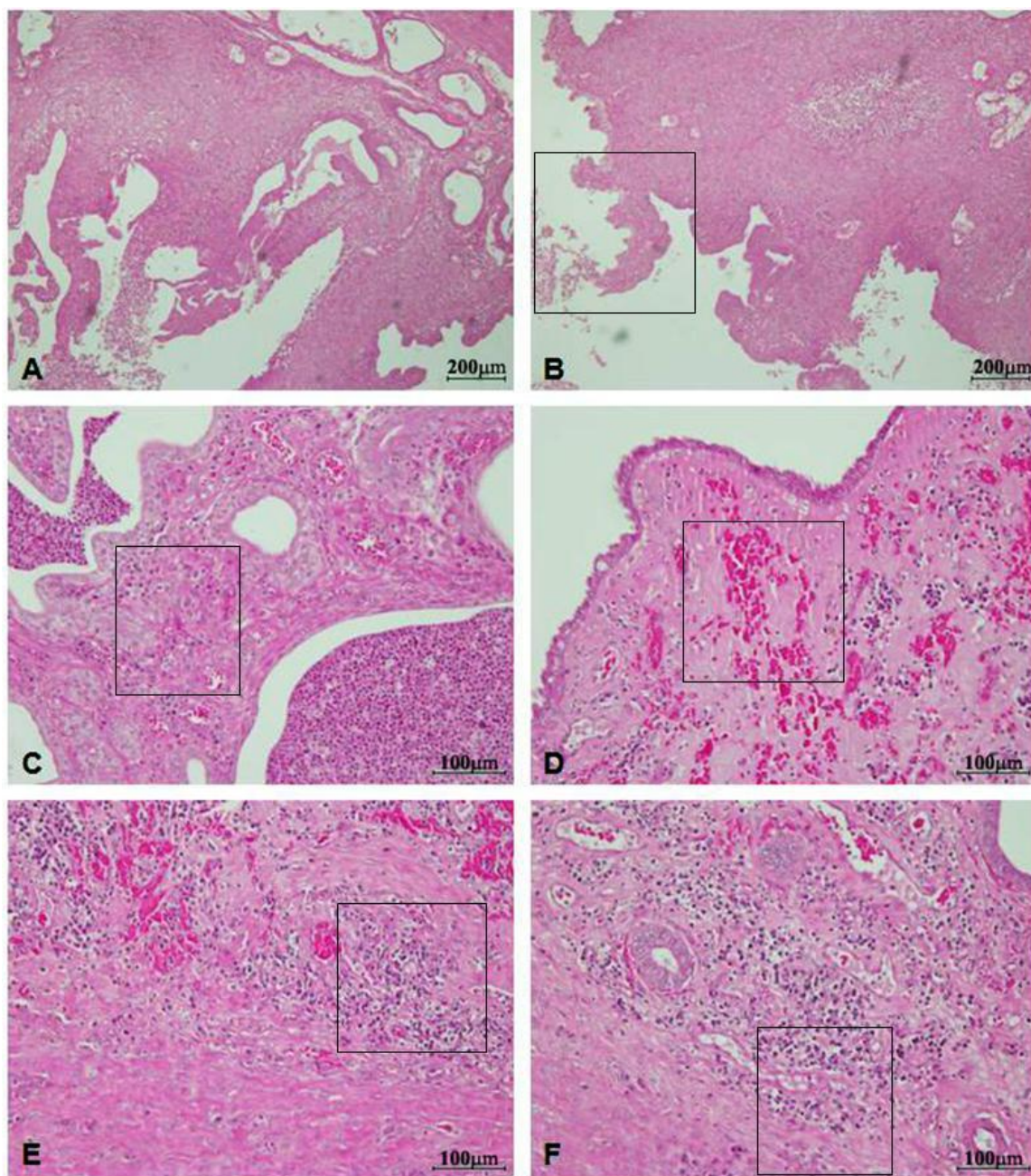


Figura 3- Exemplos de alterações histopatológicas em úteros de cadelas diagnosticadas com piômetra, cortes histológicos do útero corados com HE.

Legenda: **A-** Destruição geral do tecido (40x); **B-** Destruição do epitélio luminal (40x); **C-** Edema (100x); **D-** Extravasão de sangue (100x); **E-** Células de reação inflamatória no estroma (100x); **F-** Extensão do infiltrado inflamatório ao miométrio (100x). Os quadrados evidenciam as características em análise em cada imagem.

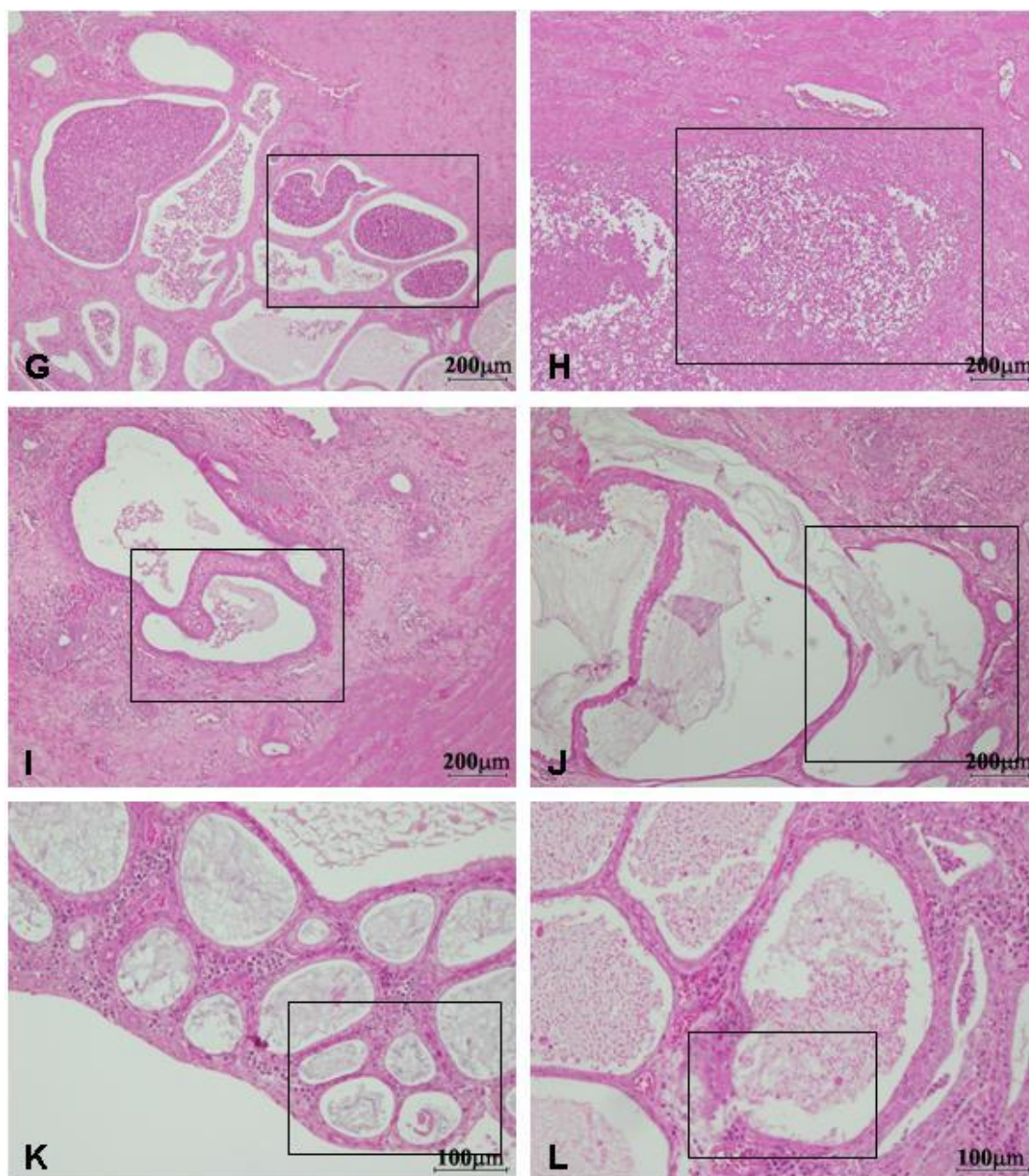


Figura 4- Exemplos de alterações histopatológicas em úteros de cadelas diagnosticadas com piômetra, cortes histológicos do útero corados com HE.

Legenda: **G-** Glândulas quísticas com neutrófilos no lúmen (40x); **H-** Abscessos no estroma (40x); **I-** Dilatação das glândulas basais (40x); **J-** Destruição e dilatação das glândulas basais (40x); **K-** Dilatação das glândulas apicais (100x); **L-** Destruição e dilatação das glândulas apicais (100x). Os quadrados evidenciam as características em análise em cada imagem.

3.2. Imunolocalização de células de reação inflamatória no útero de cadelas com piómetra e cadelas em diestro sem alterações uterinas

Neste estudo foi efectuada a imunolocalização de marcadores para linfócitos T (anti-CD3), linfócitos B (anti- CD79 α cy e anti- PAX5) e granulócitos e macrófagos (anti-calprotectina positivas, anticorpo MAC 387) em cortes histológicos de úteros com piómetra e úteros sem afeção de cadelas em diestro.

3.2.1. Avaliação qualitativa da infiltração de células de reação inflamatória na camada basal e apical do endométrio por imunohistoquímica

Do ponto de vista qualitativo, a infiltração celular associada com a reação inflamatória presente na parte basal e apical do endométrio das cadelas com piómetra era constituída por linfócitos T, linfócitos B e células de origem mielóide (granulócitos e macrófagos) (Figura 5 a 9). Na parte basal do endométrio, na maioria dos casos (79%), o infiltrado inflamatório foi composto pelos três tipos de células de reação inflamatória. As células de origem mielóide (granulócitos e macrófagos) (Figura 8-D e Figura 9) foram detetadas em todas as amostras, os linfócitos B (células marcadas com o anticorpo anti-CD79 α cy) (Figura 6-D e 9) em 94,7% das amostras e os linfócitos T em 78,9% dos casos (Figura 5-D e 9). O anticorpo anti-PAX5, para os linfócitos B, foi o menos prevalente, tendo sido detetado em 63,2% dos úteros de piómetra (Figura 7-D e 9). Por outro lado, na região basal dos úteros de diestro não patológico foram detetadas células de reação inflamatória em apenas 30% das amostras e estes infiltrados foram compostos unicamente por células de origem mielóide (anticorpo MAC 387) (Figura 8-C e 9).

No que diz respeito à camada apical dos úteros com piómetra, na maioria dos casos (94,7%) foi detetada infiltração por todos os tipos de células de reação inflamatória em estudo. Mais especificamente, esta infiltração foi composta por linfócitos T (94,7% dos casos; Figura 5-F e 9), linfócitos B (anticorpo anti-CD79 α cy em 100% dos casos; Figura 6-F e 9) e células de origem mielóide (em 100% dos casos; Figura 8-F e 9). Nas amostras de útero sem alteração na fase de diestro, foram detetados, em cerca de 20-30% das amostras, linfócitos T (Figura 5-E e 9) e células de origem mielóide (Figura 8-E e 9). Os linfócitos B não foram detetados na região apical dos úteros de diestro não patológico.

CD3

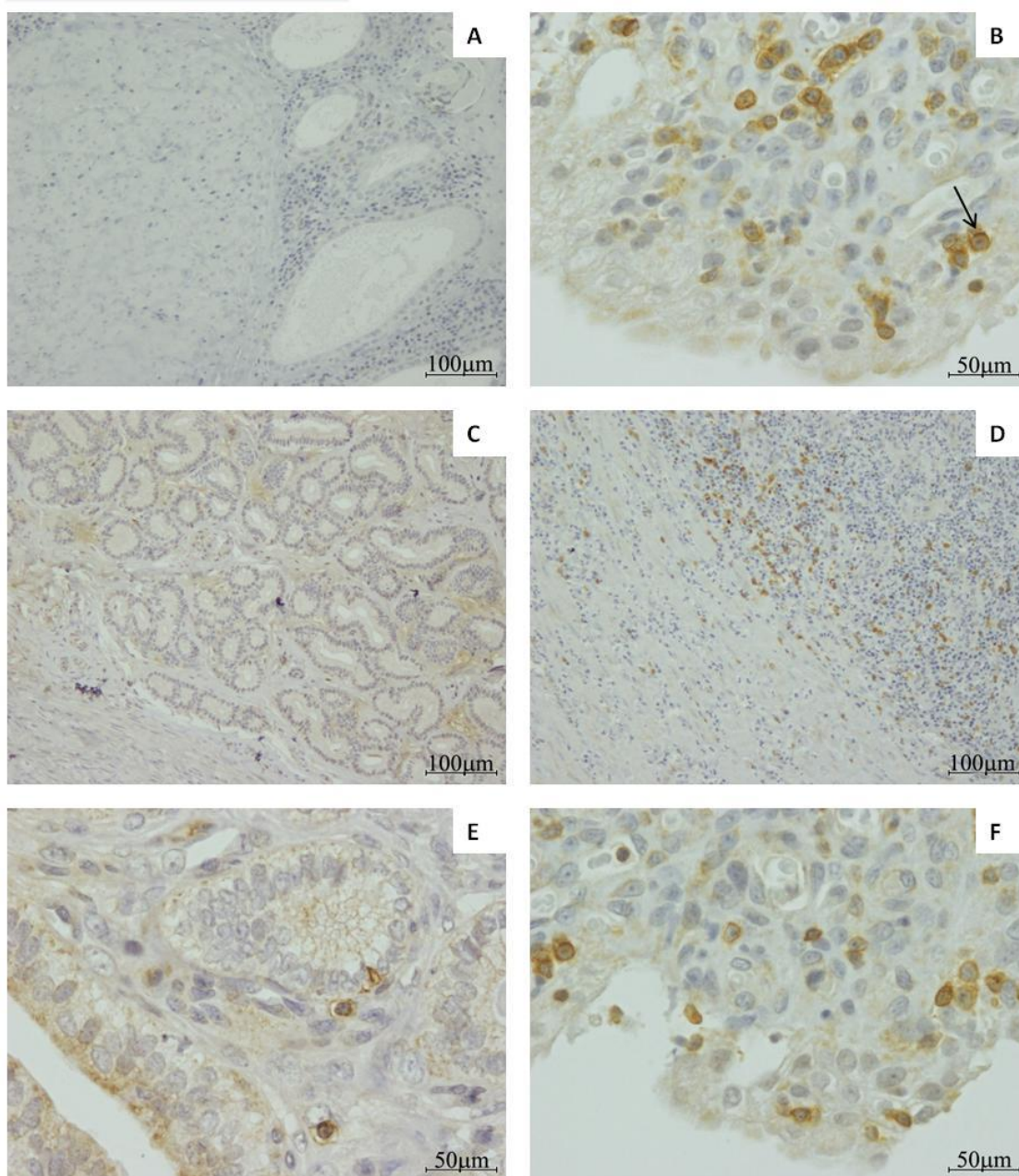


Figura 5- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de linfócitos T (anticorpo anti-CD3).

Legenda: **A**- Exemplo de controlo negativo com IgG de coelho (aumento original de 100x); **B**- Exemplo de marcação positiva com o anticorpo anti-CD3 (400x) (de acordo com as especificações do fabricante, o anticorpo marca predominantemente a região membranar embora possa, esporadicamente, marcar também o citoplasma). **C, D**- Marcação na região basal do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. **E, F**- marcação na região apical do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (400x) e do útero de cadelas com piómetra (400x), respetivamente. A seta na imagem B (indica um exemplo de células marcadas com este anticorpo).

CD79 α cy

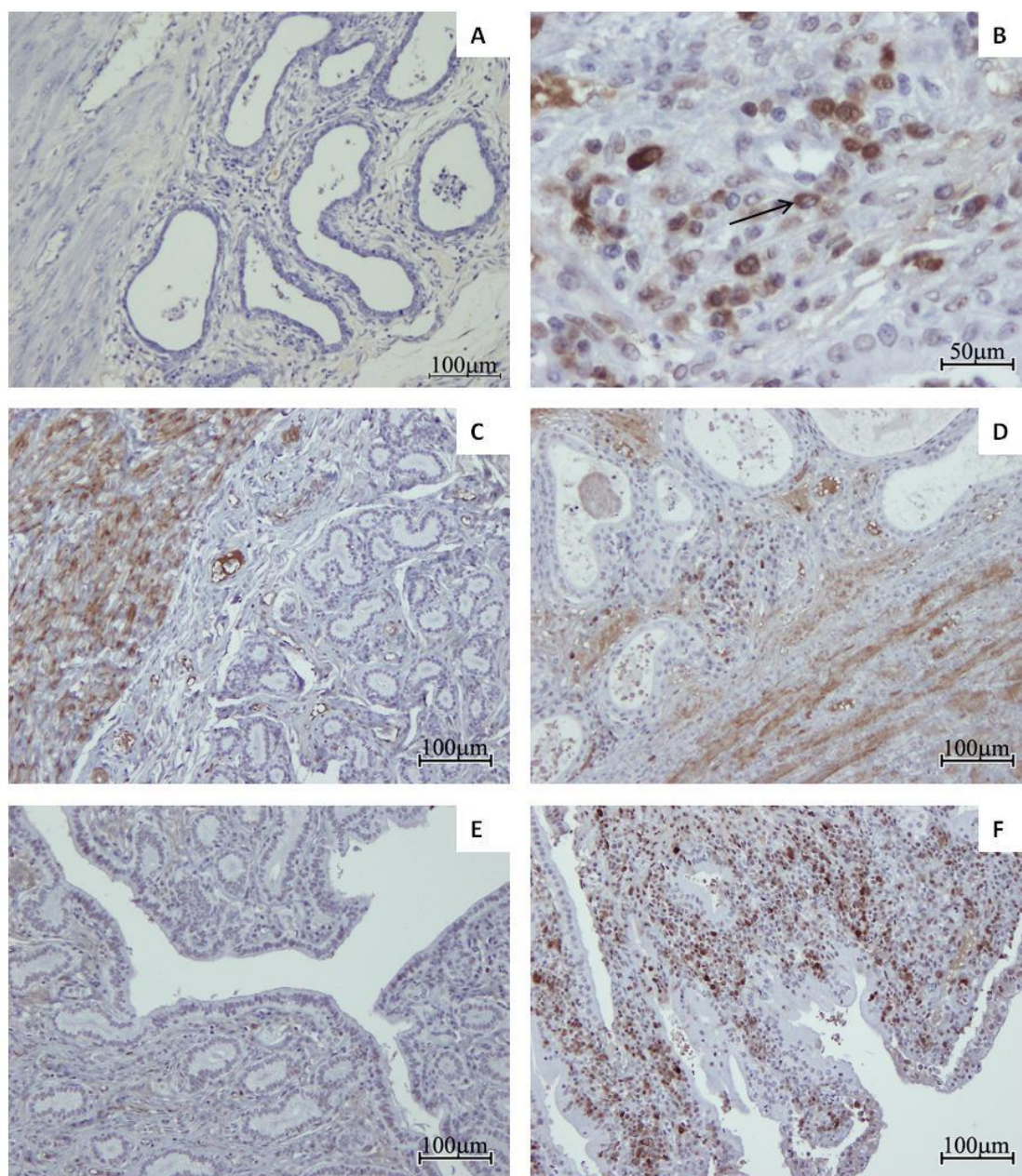


Figura 6- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de linfócitos B (anticorpo anti-CD79 α cy). **Legenda:** **A-** Exemplo de controlo negativo da técnica (substituição do anticorpo primário por PBS) (aumento original de 100x); **B-** Exemplo de marcação positiva com o anticorpo anti-CD79 α cy (400x) (de acordo com as especificações do fabricante, o anticorpo marca alguns tipos de células B precursoras, as linhas de células B maduras e o músculo liso. A marcação específica é citoplasmática ou na parte citoplasmática da membrana celular). **C, D-** Marcação na região basal do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. **E, F-** marcação na região apical do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. A seta (B) indica um exemplo de uma célula marcada.

PAX5

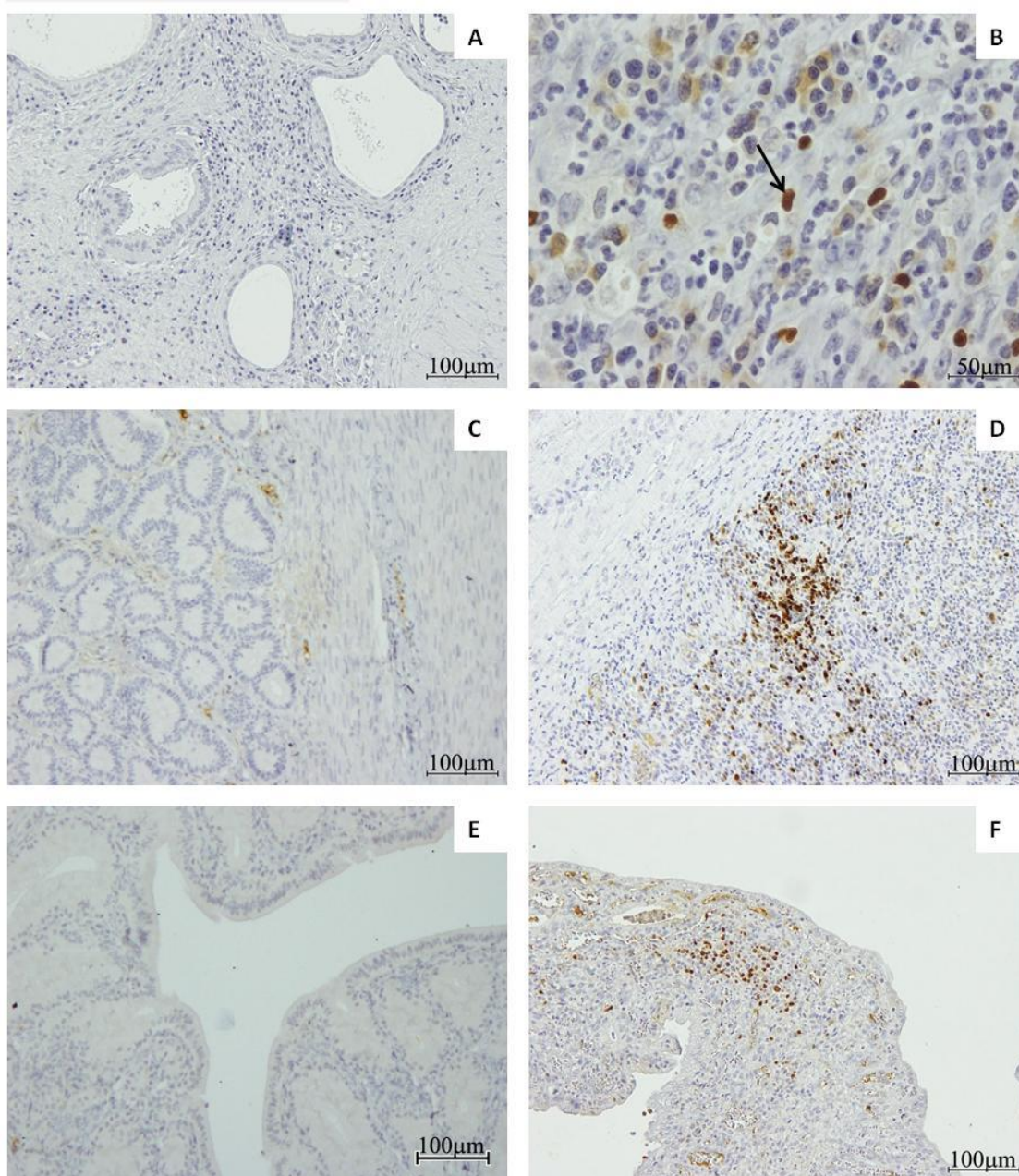


Figura 7- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de linfócitos B (anticorpo anti-PAX5).

Legenda: **A-** Exemplo de controlo negativo com PBS (aumento original de 100x); **B-** Exemplo de marcação positiva com o anticorpo anti-PAX5 (400x) (de acordo com as especificações do fabricante, o anticorpo marca células B em todos os estádios de desenvolvimento até ao estadio de plasmócitos, tipo celular que não marca. A marcação específica é nuclear). **C, D-** Marcação na região basal do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. **E, F-** marcação na região apical do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. A seta (B) indica um exemplo de uma célula marcada.

MAC 387

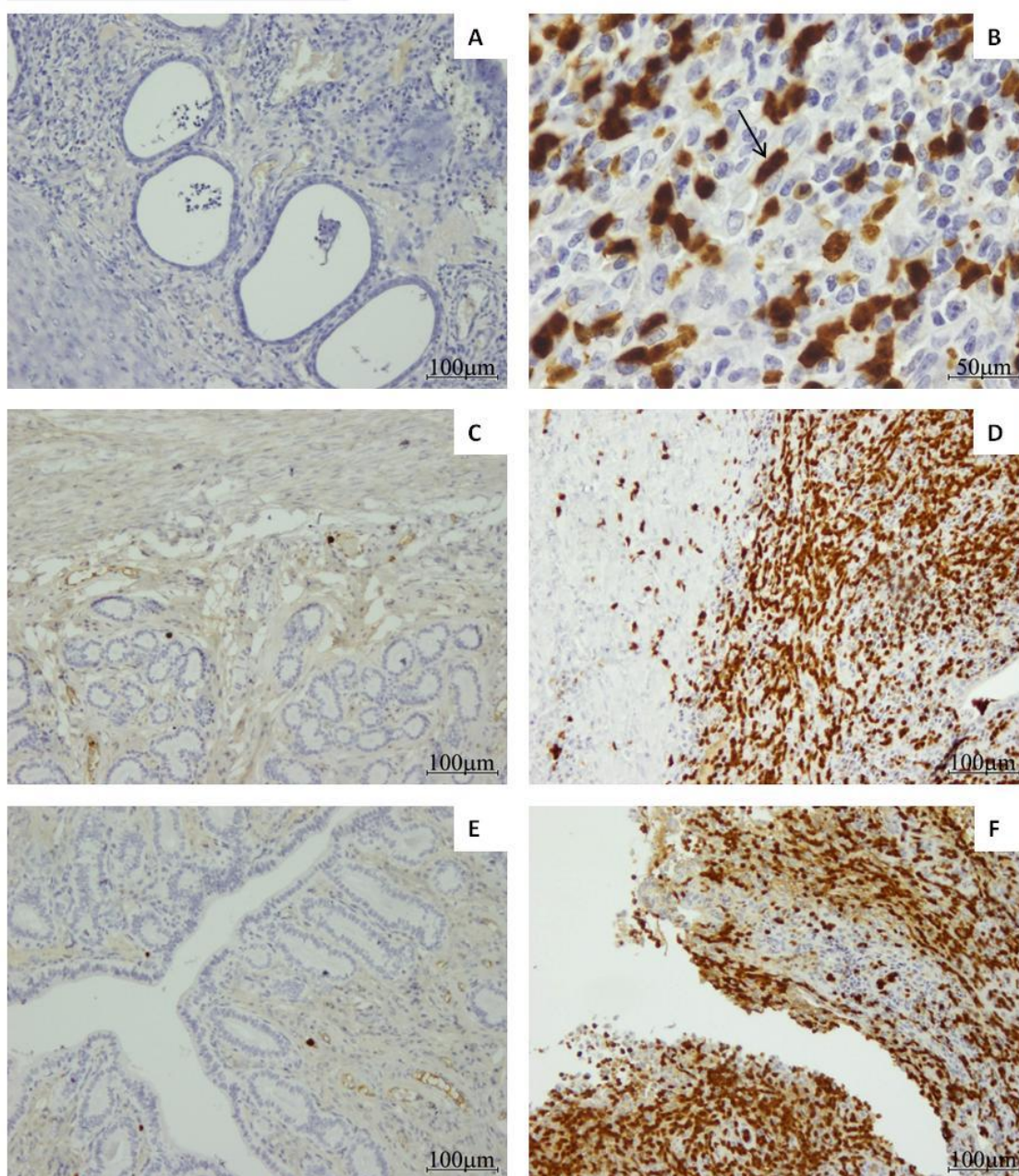


Figura 8- Análise imunohistoquímica do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina e de cadelas diagnosticadas com piómetra para localização de granulócitos e macrófagos (anticorpo anti-calprotectina-MAC 387).

Legenda: A- Exemplo de controlo negativo com IgG de murganho (aumento original de 100x); B- Exemplo de marcação positiva com o anticorpo anti-calprotectina (400x) (de acordo com as especificações do fabricante, o anticorpo marca granulócitos, monócitos e macrófagos. A marcação específica é citoplasmática). C, D- Marcação na região basal do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. E, F- marcação na região apical do útero de cadelas em diestro sem afeção uterina (100x) e do útero de cadelas com piómetra (100x), respetivamente. A seta (B) indica um exemplo de uma célula marcada.

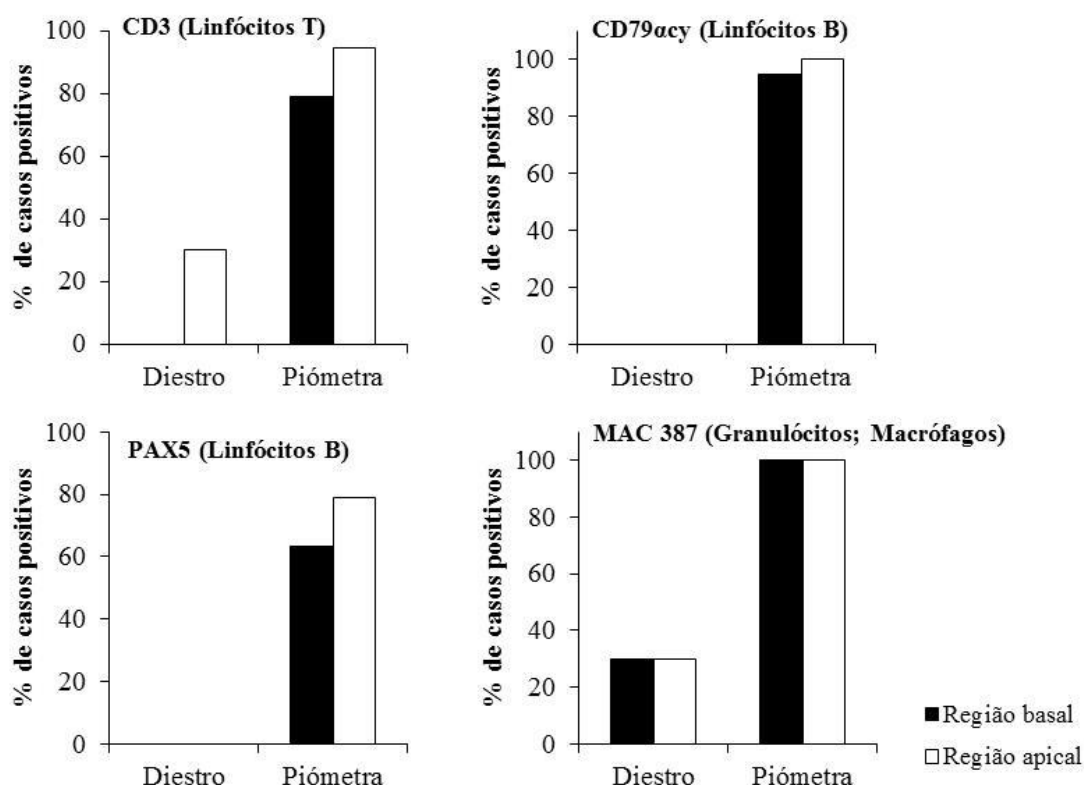


Figura 9- Percentagem de úteros de cadelas com piómetra e cadelas em diestro sem afeção uterina com infiltração de células de reação inflamatória nas regiões basal e apical do útero: linfócitos T (anticorpo anti-CD3), linfócitos B (anticorpo anti-CD79 α e anti-PAX5) e células da linha mielóide (anti-calprotectina, anticorpo MAC 387), avaliado por imunohistoquímica.

3.2.2. Avaliação semi-quantitativa da infiltração de células de reação inflamatória no estroma e glândulas

No que se refere à infiltração de células de reação inflamatória nos úteros em estudo, foi ainda efetuada uma avaliação semi-quantitativa dos vários tipos de células ao nível do estroma e glândulas (Material e Métodos, secção 2). Nos úteros com piómetra, em pelo menos metade dos casos, a infiltração no estroma revelou-se moderada a intensa para todas as células de reação inflamatória em análise (Figura 10-C e D; Tabela 6). Por outro lado, a infiltração no estroma de úteros sem alteração de cadelas em diestro foi sempre ausente ou fraca para os tipos de células de reação inflamatória em análise (Figura 10-A, Tabela 6). Nos casos de piómetra é de salientar a infiltração por células da linha mielóide (granulócitos e macrófagos marcadas com o anticorpo MAC 387) que foi intensa para todas as amostras. Relativamente aos úteros sem afeção uterina, em pelo menos 70% das amostras não foi detetada infiltração por qualquer das linhas celulares em análise. A infiltração no estroma dos

úteros de cadelas sem afeção uterina por linfócitos T (anticorpo anti-CD3) e por células da linha mielóide (anticorpo MAC 387) foi considerada fraca na maioria das amostras.

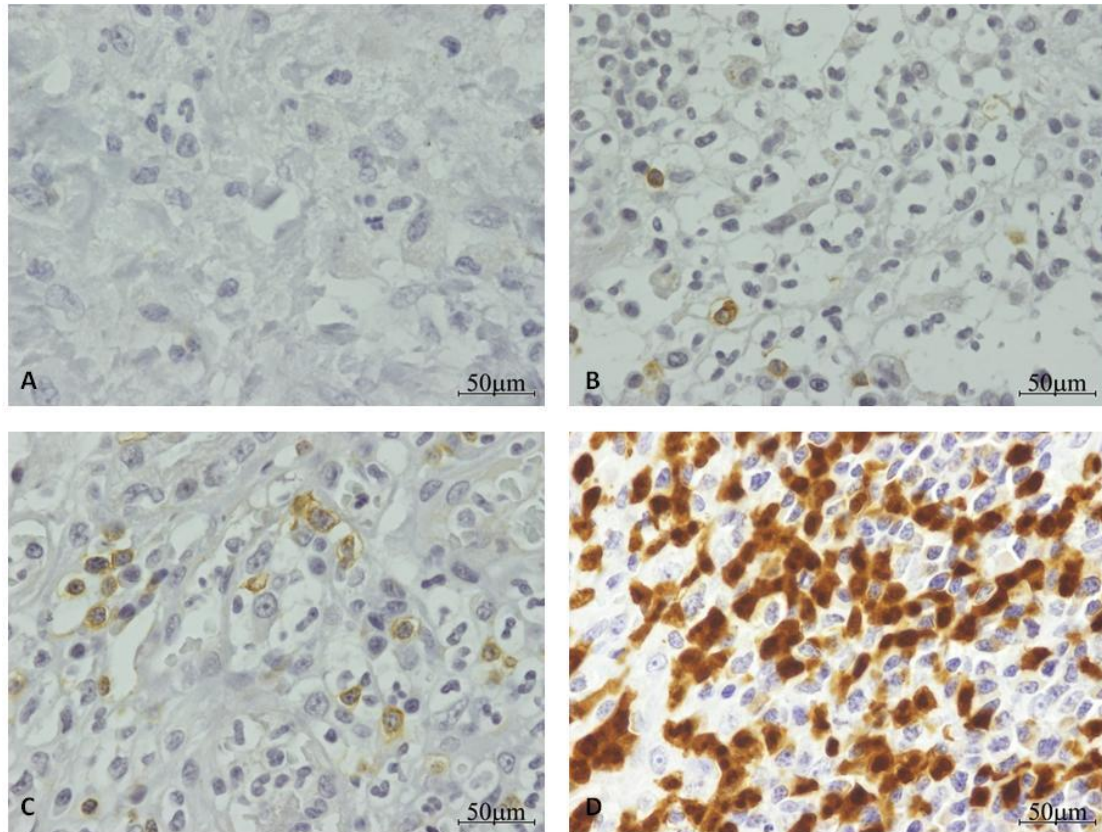


Figura 10- Cortes histológicos exemplificativos do grau de intensidade do infiltrado de células de reação inflamatória, avaliado por imunohistoquímica, no estroma de úteros com piómetra e em diestro sem afeção uterina.

Legenda: **A** (anti-CD3; ausência de marcação-grau 0); **B** (anti-CD3; marcação fraca-grau 1); **C** (anti-CD3; marcação moderada-grau 2); **D** (anti-calprotectina-MAC 387; marcação intensa-grau 3). Ampliação 400x.

Tabela 6- Classificação imunohistoquímica do grau de infiltração de células de reação inflamatória no estroma de úteros com piómetra e de úteros em diestro sem afeção uterina.

Estroma (% amostras)				
Grau da infiltração de células de reação inflamatória				
anti-CD3	0	1	2	3
Diestro	70	30	0	0
Piómetra	5,3	15,8	78,9	0
anti-CD79αcy	0	1	2	3
Diestro	100	0	0	0
Piómetra	0	0	5,3	94,7
anti-PAX5	0	1	2	3
Diestro	80	20	0	0
Piómetra	15,8	31,6	42,1	10,5
MAC 387	0	1	2	3
Diestro	70	30	0	0
Piómetra	0	0	0	100

Legenda: Graus de intensidade do infiltrado de células de reação inflamatória no estroma. **Grau 0-** Ausência de células marcadas; **Grau 1-** Marcação fraca, menos de 10 células marcadas em ampliação de 400x; **Grau 2-** Marcação moderada, entre 10 e 30 células marcadas em ampliação de 400x; **Grau 3-** Marcação intensa, mais de 30 células marcadas em ampliação de 400x.

O infiltrado de células de reação inflamatória nas glândulas basais e apicais nos úteros com piómetra é constituído principalmente por células da linha mielóide (granulócitos e macrófagos). Neste caso, o grau de infiltração detetado foi intenso (grau 3) para 84% dos casos analisados (Figura 11-D; Tabela 7). Tal como observado nos úteros de diestro sem afeção uterina, a infiltração de linfócitos nas glândulas foi considerada ausente ou fraca na maioria dos casos de piómetra. Nas amostras de úteros de diestro sem afeção uterina também não se observou infiltração de

granulócitos e macrófagos nas glândulas apicais ou basais para a maioria dos casos (90%).

É de salientar que os resultados dos dois anticorpos utilizados para marcação de linfócitos B foram diferentes, o que deverá estar relacionado com o facto de o anticorpo anti-CD79 α cy marcar todos os linfócitos B até a diferenciação plasmocitária e o anticorpo anti-PAX5 não marcar plasmócitos.

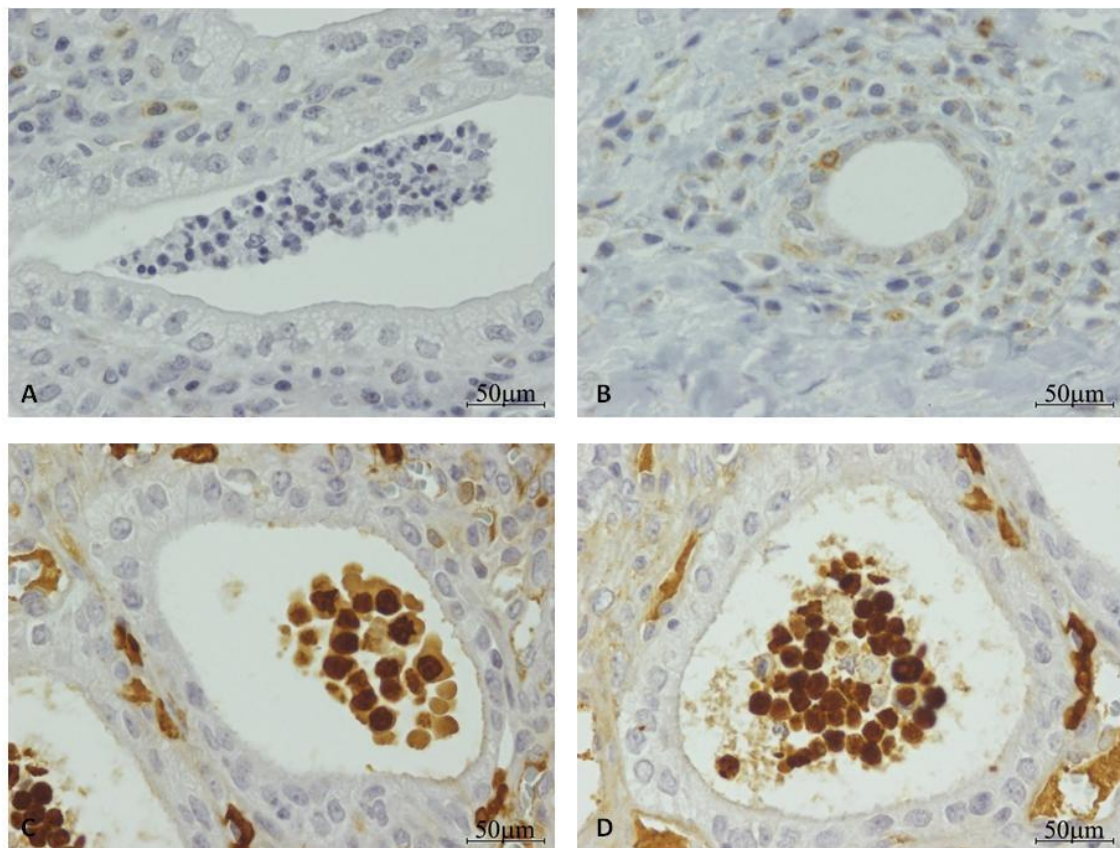


Figura 11- Cortes histológicos exemplificativos dos graus de intensidade do infiltrado de células de reação inflamatória, avaliado por imunohistoquímica, nas glândulas de úteros com piómetra e em diestro sem afeção uterina.

Legenda: **A** (anti-CD3; ausência de marcação-grau 0); **B** (anti-CD3; marcação fraca-grau 1); **C** (anti-calprotectina; marcação moderada-grau 2); **D** (anti-calprotectina-MAC 387; marcação intensa-grau 3). Ampliação 400x.

Tabela 7- Classificação imunohistoquímica do grau de infiltração de células de reação inflamatória nas glândulas de úteros com piómetra e úteros em diestro sem afeção uterina

Glândulas (% amostras)				
Grau da infiltração de células de reação inflamatória				
anti-CD3	0	1	2	3
Diestro	100	0	0	0
Piómetra	36,8	47,4	15,8	0
anti-CD79 α cy	0	1	2	3
Diestro	100	0	0	0
Piómetra	89,5	10,5	0	0
anti-PAX5	0	1	2	3
Diestro	100	0	0	0
Piómetra	78,9	10,5	5,3	5,3
MAC 387	0	1	2	3
Diestro	90	10	0	0
Piómetra	5,3	5,3	5,3	84,1

Legenda: Graus de intensidade do infiltrado de células de reação inflamatória nas glândulas. **Grau 0-** Ausência de células marcadas; **Grau 1-** Marcação fraca, menos de 10 células marcadas em ampliação de 400x; **Grau 2-** Marcação moderada, entre 10 e 30 células marcadas em ampliação de 400x; **Grau 3-** Marcação intensa, mais de 30 células marcadas em ampliação de 400x

3.3. Transcrição de genes que codificam para componentes das vias de sinalização dos recetores do tipo *Toll* e de mediadores de inflamação

Neste estudo foi efetuada a análise da transcrição de genes que codificam para componentes das vias de sinalização dos recetores do tipo *Toll* (TLRs) e de mediadores inflamatórios por RT-PCR qualitativo em amostras de endométrio de úteros com piómetra e de úteros em diestro, sem afeção. Para tal, foi testada a presença dos transcritos dos genes que codificam para componentes intervenientes na

via dependente da proteína adaptadora MyD88 (MyD88, TRAF6, NFkB) e independente de MyD88 [TRAM (TICAM2), TRIF (TICAM1), IRF-3]. Esta caracterização inicial envolveu ainda a identificação de transcritos de mediadores de inflamação produzidos em resposta à ativação destas vias: citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).

Após análise dos resultados de RT-PCR verificou-se que os transcritos de componentes de ambas as vias de sinalização, dependente e independente da proteína MyD88, estão presentes no endométrio de úteros com piómetra e de úteros sem afeção na fase de diestro (Figura 12; Tabela 8). Todos os produtos amplificados apresentaram a massa molecular (pb) esperada, não se observando amplificação no controlo negativo (CN), o que indica a ausência de contaminação com cDNA.

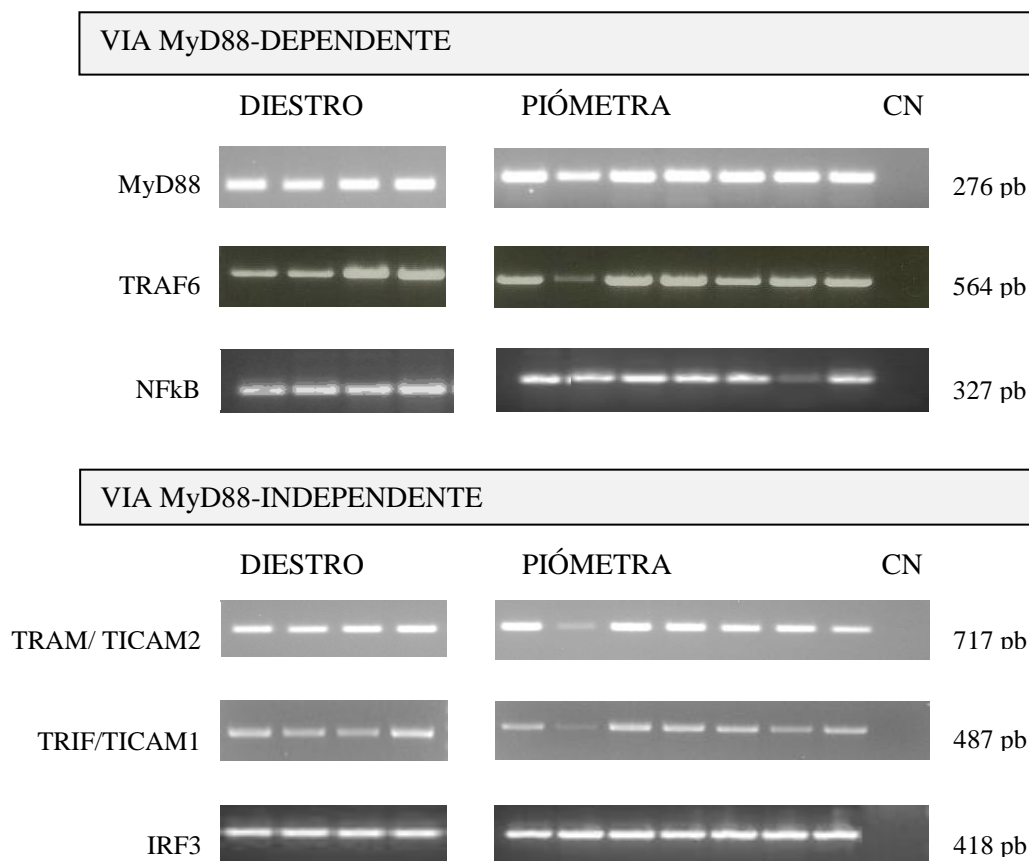


Figura 12– Exemplo dos produtos de amplificação obtidos por RT-PCR na deteção do mRNA dos componentes das vias de sinalização dos TLRs, dependente e independente de MyD88, em amostras de endométrio de úteros com piómetra e de úteros na fase de diestro sem afeção uterina. Legenda: CN- Controlo negativo.

No que diz respeito à transcrição dos genes que codificam para as citocinas pró- e anti-inflamatórias, é de realçar que os mRNAs da IL-1 β e TNF- α não foram detetados por RT-PCR no diestro não patológico (Figura 13; Tabela 8), mas encontram-se presentes nas amostras de endométrio de úteros com piómetra. Os mRNAs da IL-6, IL-8, IL-10 foram detetados tanto nas amostras de endométrio sem afeção uterina como nas amostras de endométrio de úteros com piómetra.

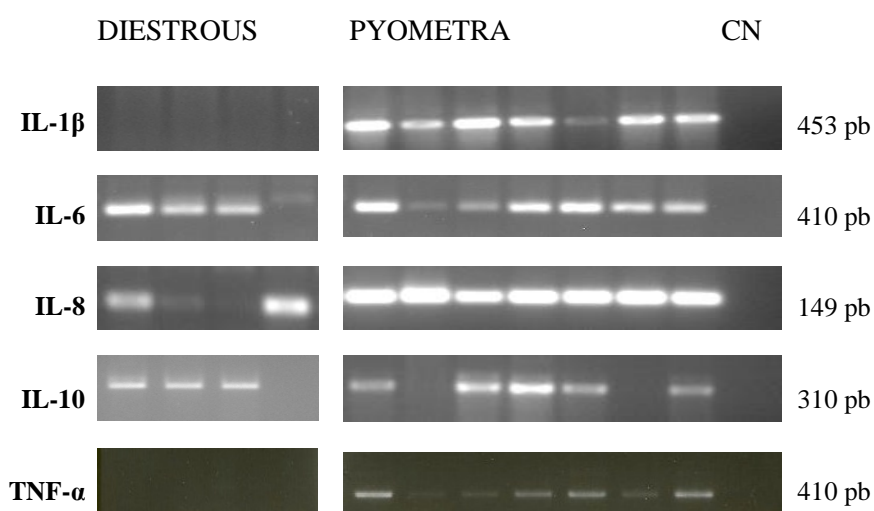


Figura 13 - Exemplo dos produtos de amplificação obtidos por RT-PCR para os transcritos das citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de endométrio de úteros com piómetra e em amostras de endométrio de úteros sem afeção uterina (diestro normal).

Legenda: CN- Controlo negativo.

Quer nas amostras de piómetra quer nas amostras de diestro sem afeção uterina, os transcritos para os componentes das vias dos TLRs foram detetados em todas as amostras de endométrio (Tabela 8). No entanto, observou-se uma diferença na prevalência dos transcritos das citocinas entre os dois grupos de amostras (Tabela 8). Embora os transcritos para as interleucinas IL-6, IL-8, IL-10 tenham sido detetados no endométrio de úteros na fase de diestro não patológico, a IL-1 β e o TNF- α parecem funcionar como marcadores imunológicos nos úteros com piómetra, uma vez que os respectivos transcritos foram detetados em todas as amostras de endométrio com piómetra e estão ausentes no endométrio de úteros sem afeção uterina. Por outro lado, os transcritos dos genes que codificam para a IL-2, IL-4, IFN- β , IFN- γ não foram detetados no endométrio de úteros com e sem piómetra.

Tabela 8- Prevalência (%) dos transcritos dos componentes das vias dependente e independente de MyD88 e dos mediadores de inflamação detetados nas amostras de endométrio de cadelas com piómetra e amostras de endométrio de cadelas sem afeção uterina.

	Diestro (n=10) %	Piómetra (n=19) %
MyD88	100	100
TRAF6	100	100
NFkB	100	100
TRAM/TICAM2	100	100
TRIF/TICAM1	100	100
IRF-3	100	100
IL-1 β	0	100
IL-6	40	100
IL-8	50	100
IL-10	38	81
TNF- α	0	100

3.4. Quantificação da expressão de mRNA de componentes envolvidos na resposta imunitária, por PCR em tempo real

Neste estudo foi ainda efetuada a quantificação da expressão do mRNA de componentes da resposta imunitária nas amostras de endométrio de úteros com piómetra por comparação com as de diestro sem afeção. A quantificação dos transcritos foi efetuada por PCR em tempo real para os mRNAs de recetores envolvidos na interação com o LPS e outros componentes bacterianos (*TLR2*, *TLR4* e *CD14*), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β) e proteínas envolvidas na remodelação tecidual (metaloproteinases 1 e 9).

A transcrição dos genes *TLR2*, *TLR4* e *CD14* foi significativamente maior (*TLR2* e *CD14* $p<0,001$; *TLR4* $p<0,01$) nas amostras de piómetra, quando comparado com as amostras de endométrio sem alteração (Figura 14). Os mRNA dos genes *TLR4*, *TLR2* e *CD14* apresentaram uma expressão 3,4; 25,9 e 15,4 vezes superior no endométrio com piómetra, respectivamente.

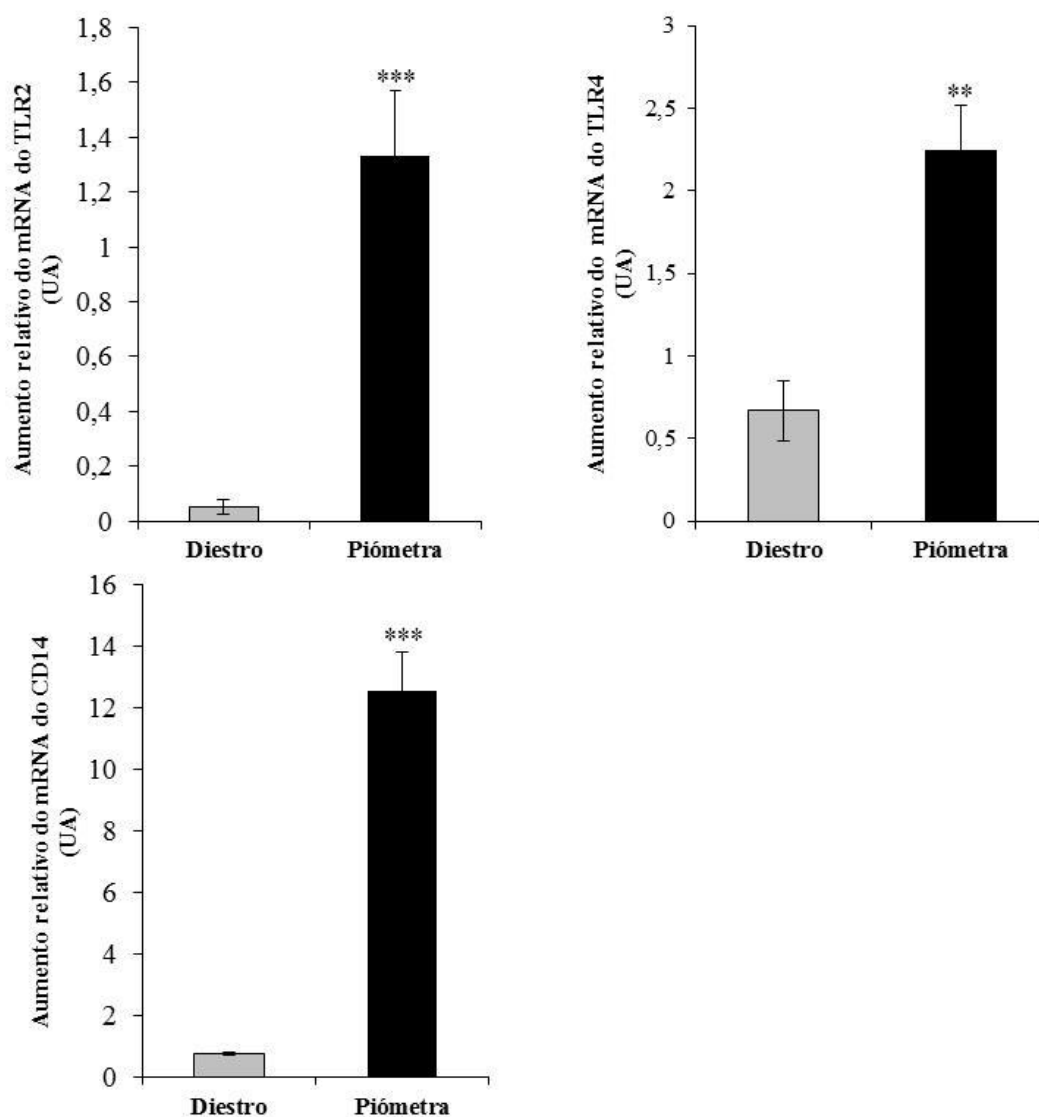


Figura 14- Expressão relativa do mRNA (Unidades Arbitrárias-UA) dos recetores, TLR2, TLR4 e CD14 avaliado por PCR em tempo real em amostras de endométrio de cadelas com piómetra (n=17) e em amostras de endométrio controlo sem afeção uterina (diestro normal) (n=5).

Legenda: **P< 0,01; ***P<0,001.

Os genes que codificam para as citocinas pró e anti-inflamatórias foram significativamente mais transcritos ($P<0,001$ para *IL-1 β* , *TGF- β* , *IL-10*, *IL-8* e $P<0,025$ para *IL-6*) nas amostras de piómetra comparativamente às amostras de endométrio de úteros sem afeção (Figura 15). A transcrição diferencial dos genes das citocinas nas amostras de piómetra foi mais acentuada para o mRNA da *IL-1 β* que foi 1611,9 vezes mais expresso, seguido do mRNA da *IL-8* que foi 1380,8 vezes mais expresso nos casos de piómetra. O mRNA para a *IL-10*, *IL-6*, *TGF- β* foi

igualmente mais expresso nas amostras de piómetra (33,7; 4,6; 8,6 vezes mais expresso, respetivamente).

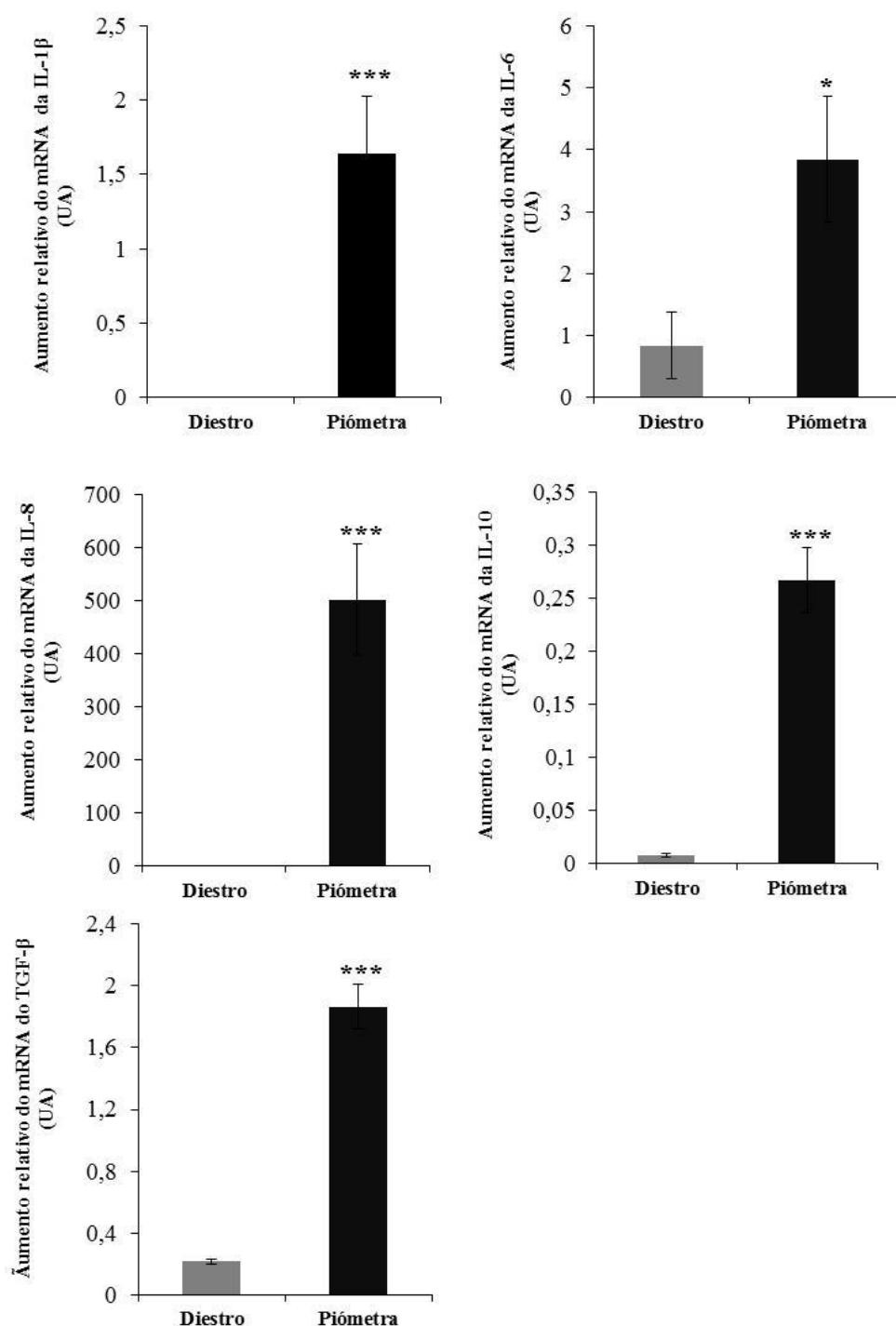


Figura 15- Expressão relativa do mRNA (Unidades Arbitrárias-UA) das citocinas pró e anti-inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β, por PCR em tempo real, em amostras de endométrio de úteros com piómetra (n=17) e de úteros sem afeção (n=5).

Legenda: *P<0,025; ***P<0,001.

No que diz respeito à transcrição dos genes que codificam para a metaloproteinase 1 (MMP1) e metaloproteinase 9 (MMP9) (Figura 16), os níveis de expressão dos respetivos mRNAs foram também significativamente maiores nas amostras de endométrio de úteros com piómetra ($P<0,001$), comparativamente às amostras de endométrio de úteros sem afeção uterina. Para o gene da MMP1, a expressão do mRNA foi 4223,2 vezes superior nas amostras de piómetra e para o gene da MMP9 verificou-se um aumento de 2836,4 vezes quando comparado com as amostras de úteros em diestro sem afeção uterina. O aumento significativo de expressão do mRNA da MMP1 e 9 nas amostras de endométrio com piómetra deve-se ao facto de os genes para estas proteínas não serem transcritos no endométrio de diestro sem afeção uterina (Figura 16).

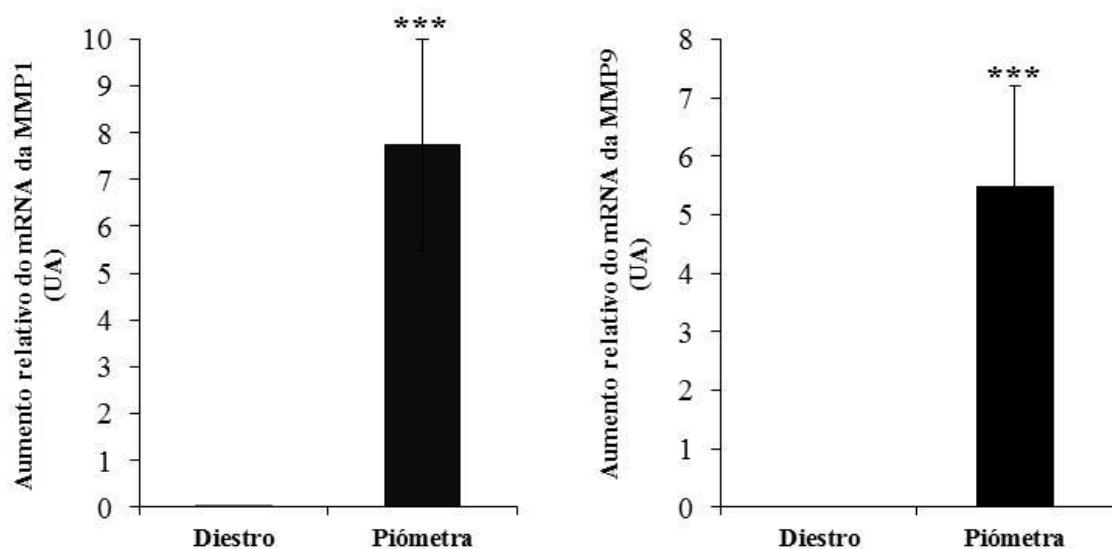


Figura 16- Resultados da quantificação relativa (Unidades Arbitrárias-UA) dos mRNAs da MMP1 e MMP9 por PCR em tempo real em amostras de endométrio de úteros com piómetra comparativamente a amostras de endométrio de úteros sem afeção (diestro normal).

Legenda: ***, $P<0,001$.

4. Discussão

Este trabalho teve por objetivo a caracterização da resposta inflamatória no útero de cadelas com diagnóstico de piómetra por *E. coli*. Os estudos relacionados com a identificação do tipo de células de reação inflamatória e determinação da sua prevalência no útero de cadelas com piómetra são escassos (Bartoskova *et al.*, 2012), sendo importante esta caracterização para elucidação dos mecanismos de defesa do útero contra *E. coli*.

As amostras de útero foram inicialmente caracterizadas de forma a identificar as alterações histológicas associadas às piómetras em estudo. Deste modo, foram avaliados 19 úteros de cadelas com piómetra e 10 úteros sem afeção de cadelas em diestro, através de cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina. Todos os úteros de cadelas com piómetra apresentaram neste trabalho características frequentemente associadas a esta doença, nomeadamente a destruição do epitélio luminal, a presença de células de reação inflamatória e a dilatação das glândulas endometriais que se apresentaram com aspeto quístico e, na maior parte dos casos, com neutrófilos no lúmen. Embora a hiperplasia quística do endométrio e piómetra possam surgir como entidades separadas (De Bosschere *et al.*, 2001), todos os casos de piómetra analisados neste trabalho estavam associados a hiperplasia quística do endométrio, o que poderá estar relacionado com o desenvolvimento de piómetra numa fase em que a hiperplasia já está instalada. Com o avançar da idade (neste estudo, os animais tinham em média 9,7 anos), a probabilidade de aparecimento de hiperplasia quística, associada ao efeito cumulativo da progesterona em consequência do maior número de ciclos éstricos, é elevada. Por sua vez, as alterações uterinas induzidas pela hiperplasia quística favorecem a proliferação das bactérias e o estabelecimento da infeção. No entanto, a hiperplasia quística poderá também ser inicialmente induzida pelo estímulo proliferativo associado a uma infeção subclínica (Verstegen *et al.*, 2008). As piómetras analisadas foram também caracterizadas por uma reação inflamatória exuberante. A análise histológica e caracterização do exsudado inflamatório por imunohistoquímica permitiu constatar que as células de reação inflamatória estavam presentes no estroma do endométrio, no lúmen das glândulas endometriais e, em cerca de 50% dos casos, no miométrio. Essa infiltração celular associada à reação inflamatória era composta por linfócitos T, linfócitos B, e granulócitos e macrófagos. Embora não se tenha utilizado um

marcador específico para neutrófilos, nos cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina foi possível detetar infiltração por este tipo de células em todos os casos de piómetra. No estroma a infiltração foi intensa para os linfócitos B (desde células pré-B até plasmócitos; anticorpo anti-CD79 α cy) e para as células da linha mielóide na maioria dos casos ($\geq 94\%$). Nas glândulas endometriais, a infiltração era principalmente constituída por células da linha mielóide (granulócitos e macrófagos). A deteção de neutrófilos e linfócitos nos nossos casos de piómetra está também de acordo com o que foi anteriormente descrito por Dow (1957, 1958) para a hiperplasia quística do endométrio associada à piómetra, o que reforça a ideia de que estas células são um importante componente dos mecanismos de defesa imunitária do útero.

Pelos nossos resultados podemos concluir que, nos casos de piómetra, as células de reação inflamatória responsáveis pelas funções fagocitárias no útero são os neutrófilos e os macrófagos (marcados pelo anticorpo MAC 387), estando a resposta imunitária humoral a cargo dos linfócitos B. O tipo e distribuição das células inflamatórias nos úteros com piómetra refletem uma resposta inflamatória contínua e associada com a gravidade da doença. Particularmente, a presença de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) reflete uma situação de inflamação crónica, associada à persistência do estímulo, neste caso da bactéria *E. coli*. Por outro lado, em cerca de 20% dos úteros sem afeção na fase de diestro foram detetados linfócitos T e células da linha mielóide, sendo no entanto os linfócitos B específicos da condição de piómetra. A presença de células de reação inflamatória em úteros saudáveis está relacionada com a estimulação por microrganismos que contaminam o útero sem promover doença durante o proestro e estro, altura em que o cérvix está aberto. Estes resultados estão de acordo com os descritos em úteros saudáveis de vacas e ovelhas em que se verificou que os linfócitos T são raros, aparecendo em poucas amostras, e as células B estão ausentes (Cobb & Watson, 1995).

Na tentativa de caracterizar os mecanismos de defesa do hospedeiro, neste estudo foi ainda analisada a transcrição de genes que codificam para componentes das vias de sinalização dos TLRs (MyD88 dependente e TRIF dependente) no endométrio da cadela com piómetra por comparação com o diestro sem afeção. A via dependente da proteína adaptadora MyD88 é desencadeada pela ativação de todos os TLRs, à exceção do TLR3, leva à ativação do fator de transcrição NFkB e culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias. A via independente de MyD88 (dependente

de TRIF) é específica dos TLRs 4 e 3, conduz à ativação dos fatores de transcrição IRF-3/IRF-7 (Fator regulador do interferão 7) e leva à produção de interferões do tipo I. Os resultados da transcrição obtidos demonstraram que os componentes das duas vias de sinalização (MyD88 dependente: MyD88, TRAF6, NFkB; TRIF dependente: TRAM, TRIF, IRF-3) são constitutivamente transcritos no endométrio da cadela, tendo sido detetados quer no endométrio de úteros sem afeção quer no endométrio de úteros com piómetra. Uma vez que a via de sinalização dependente e independente de MyD88 podem ser ativadas por diferentes TLRs, estes resultados demonstram que o útero da cadela tem capacidade de reconhecer uma variedade de componentes dos microrganismos invasores através de diferentes TLRs que por sua vez ativam duas vias de resposta distintas. A ativação de vias de defesa inata no útero sem afeção de cadelas em diestro deverá constituir um mecanismo de resposta rapidamente mobilizado em caso de infeções ascendentes (Zähringer *et al.*, 2008). Esta conclusão é corroborada por estudos anteriores em que foi demonstrada a transcrição de genes que codificam para vários TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9) no endométrio de cadelas em diestro sem afeção (Silva *et al.*, 2012). À semelhança de estudos anteriormente realizados no nosso laboratório (Silva *et al.*, 2012), neste trabalho verificou-se que, embora os transcritos do TLR2, TLR4 e CD14 tenham sido detetados nas amostras de endométrio sem afeção, os níveis de transcrição foram significativamente superiores nas amostras de piómetra.

Ainda que os transcritos da via MyD88 dependente e independente tenham sido ambos detetados no endométrio da cadela, é importante salientar que são necessários estudos adicionais para comprovar que estas vias participam na resposta à infeção do útero por *E. coli*. Apesar da via dependente de TRIF estar principalmente associada à defesa contra infeções virais, induzindo a produção de interferões, têm surgido descrições da participação desta via na defesa contra infeções por bactérias *Gram* negativas, nomeadamente por *Pseudomonas aeruginosa* (Carrigan *et al.*, 2010) e *Chlamydophila pneumoniae* (Buß *et al.*, 2010). A ativação da via é comprovada pela translocação do fator de transcrição IRF-3, depois de ativado, do citoplasma das células infetadas para o núcleo onde irá promover a transcrição dos interferões do tipo I (Buß *et al.*, 2010; Carrigan *et al.*, 2010). Assim, na ausência de estímulo o fator IRF-3 é expresso, no entanto permanece no citoplasma das células não havendo transcrição dos genes que codificam os interferões. No nosso estudo, não foi possível detetar por RT-PCR os transcritos dos genes que codificam para o IFN-β e IFN-γ no

endométrio da cadela, quer no diestro sem afeção quer nos casos de piómetra. Do mesmo modo, num estudo semelhante em que se analisaram as alterações globais da transcrição no endométrio da cadela com piómetra por comparação com o diestro sem afeção, pela técnica de *microarrays*, também não foi detetado um aumento da transcrição dos genes da família dos interferões na piómetra (Hagman *et al.*, 2009). O IFN- γ também não foi detetado no soro de cadelas diagnosticadas com piómetra (Karlsson *et al.*, 2012).

Apesar da transcrição dos genes dos componentes da via TRIF-dependente não ser por si só indicativo da ativação da via, no nosso estudo, a ausência dos transcritos para os interferões pode ser explicada pelo facto de estes serem apenas transcritos numa fase inicial da infeção. Num estudo anterior de avaliação dos mecanismos de resposta à infeção no pulmão de murganho por *Pseudomonas aeruginosa*, verificou-se que a síntese do mRNA do IFN- β ocorria 4 horas após a infeção e voltava a níveis basais em 24 horas (Carrigan *et al.*, 2010).

Na via dependente de MyD88, o fator de transcrição NFkB é o regulador central, regulando a transcrição de diversos mediadores da inflamação. Tal como o IRF-3, o NFkB é constitutivamente expresso e em células não estimuladas permanece no citoplasma na forma inativa (Bashir *et al.*, 2011). Na presença de um estímulo, o NFkB é translocado para o núcleo onde regula a transcrição dos genes alvo, incluindo as citocinas pró-inflamatórias. Neste estudo foi avaliada a presença de transcritos de citocinas pró e anti-inflamatórias, indicativo da ativação da via MyD88. Os mRNAs das citocinas avaliadas apresentaram um padrão de expressão diferencial no endométrio de cadelas sem afeção e cadelas com piómetra. Os mRNAs da IL-1 β e TNF- α não foram detetados por RT-PCR no diestro não patológico contrariamente aos mRNAs da IL-6, IL-8, IL-10 que foram detetados tanto no diestro não patológico como nas amostras de endométrio de úteros com piómetra. A quantificação dos transcritos da IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 por PCR em tempo real demonstrou ainda que os mesmos se encontram em níveis significativamente superiores nas amostras de endométrio com piómetra. Uma vez que os mRNAs da IL-1 β e TNF- α não foram detetados no endométrio saudável e estavam presentes em todas as amostras com piómetra, estas citocinas poderão funcionar como marcadores da infeção uterina por *E. coli* na cadela. O aumento da transcrição da IL-1 β é ainda suportada por estudos anteriores em que se verificou um aumento da expressão do mRNA da IL-1 β no útero de 4 cadelas com piómetra pela técnica de *microarrays*

(Hagman *et al.*, 2009). O mRNA das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 aqui observado poderá ser produzido pelas células epiteliais, do estroma e células de reação inflamatória. Cronin *et al.* (2012), em culturas de células epiteliais e do estroma do endométrio de vaca estimuladas com LPS, mostraram que ocorria um aumento de expressão dos mRNAs da IL-1 β , IL-6, IL-8 nas células epiteliais estimuladas e do mRNA da IL-1 β e IL-8 nas células do estroma por comparação com os controles não estimulados. Por outro lado, estudos semelhantes demonstraram que as células epiteliais e do estroma do endométrio de ratinho, quando estimuladas com LPS, não produzem TNF- α (Sheldon & Roberts, 2010). No nosso estudo as células de reação inflamatória poderão também ser as células responsáveis pela produção de TNF- α , nomeadamente os macrófagos. Desta forma, a fraca infiltração detetada com o anticorpo MAC 387 (para granulócitos e macrófagos) identificada nas amostras de diestro sem afeção (20% das amostras) não seria suficiente para detetar o mensageiro do TNF- α por RT-PCR.

Neste estudo foi também incluída a análise da transcrição de citocinas anti-inflamatórias, como é o caso da IL-10 e TGF- β . A IL-10 pode ser produzida por macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e várias sub-populações de linfócitos T CD4 e CD8-positivas regulando a resposta inflamatória através da inibição da produção de diversas citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos, macrófagos e células T (Couper *et al.*, 2008). A produção de IL-10 ao inibir a resposta inflamatória, pode limitar a eliminação do microrganismo invasor mas também limitar a destruição do tecido induzida pela ativação excessiva do sistema imunitário, podendo assim também ser benéfica para o hospedeiro. Apesar da transcrição do gene da IL-10 ser significativamente superior na piómetra, o transcrito foi detetado quer nas amostras de piómetra (81% das amostras), quer nas amostras de diestro sem afeção (38%). A presença de IL-10 no útero de cadelas em diestro sem afeção deverá constituir um mecanismo para limitar a reação inflamatória desencadeada pela contaminação por microrganismos que ascendem ao útero durante o proestro e estro. Neste caso, a IL-10 deverá inibir a produção excessiva de TNF- α , IL-6 e IL-8 detetados no diestro impedindo desta forma o desencadear de uma reação inflamatória exacerbada. Apesar do mRNA da IL-10 estar aumentado na piómetra (33,7 vezes superior quando comparado com o diestro sem afeção), o aumento da expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-8) é bastante superior (1611,9 e 1380,8 vezes mais expresso na piómetra, respetivamente). Este

resultado sugere que a IL-10 produzida é insuficiente para contrabalançar a inflamação exacerbada que se observa nos casos de piómetra. A reação inflamatória detetada na piómetra é também regulada por metaloproteinases (MMPs), enzimas envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular. Os transcritos das metaloproteinases 1 e 9 estavam aumentados no endométrio das cadelas com piómetra em estudo, principalmente nas cadelas com metrite, por comparação com o diestro sem afeção. A expressão das MMPs é estimulada por mediadores da inflamação, como é o caso do TNF- α e citocinas, e por sua vez as MMPs degradam os componentes da matriz promovendo a migração e recrutamento de células de reação inflamatória, potenciando desta forma a reação inflamatória (Chen *et al.*, 2013).

O TGF- β , outra citocina anti-inflamatória, é produzido principalmente por linfócitos T ativados e por macrófagos estimulados e desempenha um papel crucial na supressão da resposta imunitária, estando descritos vários mecanismos moleculares através dos quais o TGF- β exerce a sua função imunossupressora. Entre outras funções, destaca-se o papel do TGF- β na inibição da proliferação de linfócitos T e B, inibição da produção das citocinas IL-2 e IL-4, inibição da ativação de macrófagos e supressão de células dendríticas (Yoshimura *et al.*, 2010). Neste trabalho verificámos que o mRNA do TGF- β está aumentado (8,6 vezes) nas amostras de piómetra, o que está de acordo com o observado em estudos de *microarrays* efetuados em 4 úteros de cadelas com piómetra (Hagman *et al.*, 2009). O aumento da transcrição do TGF- β , e consecutivamente da produção da respetiva proteína, poderá justificar o facto de não detetarmos IL-2 e IL-4 no endométrio de cadelas com piómetra. Estas citocinas têm sido também principalmente associadas a mecanismos de defesa contra infeções virais, o que suporta os nossos resultados e os descritos por Karlsson *et al.* (2012) em que não foi detetada a IL-4 no soro de cadelas com piómetra.

5. Conclusão

A piómetra está associada a uma reação inflamatória exuberante, demonstrado pela presença marcada de células de reação inflamatória no útero e pelo aumento da transcrição de genes que codificam para citocinas pró- e anti-inflamatórias no endométrio. Os resultados da transcrição das citocinas pró- e anti-inflamatórias sugerem também que existe um desequilíbrio entre a resposta anti-inflamatória e pró-inflamatória. Esta conclusão está de acordo com o diagnóstico de piómetra numa fase tardia da infecção, o que reforça a necessidade de estudos futuros *in vitro* e/ou *in vivo* que permitam a análise dos mecanismos de resposta do hospedeiro numa fase inicial da infecção. Embora os genes que codificam para os componentes das duas vias de sinalização sejam constitutivamente transcritos no endométrio da cadela, são ainda necessários estudos complementares que visem a elucidação da participação da via independente de MyD88, mediada por TRIF/IRF-3, como mecanismo de resposta à infecção por *E. coli* no útero.

6. Bibliografia

- Ala-aho, R., Kähäri, V.-M. (2005). "Collagenases in Cancer". *Biochimie*, 87, pp. 273-86.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity", *Cell*, 124, pp. 783–801.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., Pacheco, F. C. (2012) "*Fundamentos de Imunologia*", (2^a Ed.), Lisboa: Lidel.
- Bartoskova, a, Turanek-Knotigova, P., Matiasovic, J., Oreskovic, Z., Vicenova, M., Stepanova, H., Ondrackova, P., *et al.* (2012). "γδ T lymphocytes are recruited into the inflamed uterus of bitches suffering from pyometra". *Veterinary journal* 194(3), pp.303–8, London, England: 1997.
- Bashir, A., Banday, M. Z., & Haq, E. (2011). "Lipopolysaccharide, Mediator of Sepsis Enigma: Recognition and Signaling", *International Journal of Biochemistry Research & Review* 1(1): pp.1-13.
- Buß, C., Opitz, B., Hocke, A., Lippmann, J., Laak, V., Hippenstiel ,S., Kru" ll, M., Suttorp, N., and Eitel, J. (2010) "Essential Role of Mitochondrial Antiviral Signaling, IFN Regulatory Factor (IRF)3, and IRF-7 in Chlamydomydia pneumoniae-Mediated IFN- γ Response and Control of Bacterial Replication in Human Endothelial Cells", *The Journal of immunology*, 184:pp.3072-3078.
- Carrigan, S. O., Junkins R., Yang, Y. J., Macneil, A., Richardson, C., Johnston, B., & Lin, T.-J. (2010). "IFN regulatory factor 3 contributes to the host response during Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice". *Journal of immunology* 185(6), pp. 3602–9, Baltimore, Md.: 1950.
- Chen, Y.M.M., Wright, P.J., Lee, C.S., Browning, G.F., (2003). "Uropathogenic virulence factors in isolates of Echerichia coli from clinical cases of canine pyometra and feces of canine pyometra and feces of healthy bitches". *Veterinary Microbiology*. 94, pp. 57-69.
- Chen, Q., Jin, M., Yang, F., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2013). "Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling". *Mediators of inflammation*, V. 2013, Article ID 928315, 14 pages
- Cobb, S.P., Watson, E.D., (1995). "Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle" *Research in veterinary science*. 59, pp. 238-241.

- Concannon, P.W. (2010). "Reproductive cycles of the domestic bitch". *Animal Reproduction Science*, 124, pp. 200-10.
- Couper, K. N., Blount, D. G., & Riley, E. M. (2008). "IL-10: the master regulator of immunity to infection". *Journal of immunology*, 180(9), pp. 5771–7, Baltimore, Md.: 1950
- Cronin, J. G., Turner, M. L., Goetze, L., Bryant, C. E., & Sheldon, I. M. (2012). "Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium". *Biology of reproduction*, 86(2), 51.
- Cruvinel, W. D. M., Júnior, D. M., Antônio, J., Araújo, P., Tieko, T., & Catelan, T. (2010). "Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória", 55(11).
- DeClerck, Y. (2000). "Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer." *European Journal of Cancer* 36: pp.1258-68.
- Delves PJ, Roitt D. (2000) "The Immune System – First of two parts". *The New England Journal of Medicine*; 343:pp.37-50.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., & Coryn, M. (2001). "Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?". *Theriogenology*, 55(7), pp.1509-1519.
- Dow, C. (1957). "The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch". *The Veterinary Record*, 69(50), pp.1409-1414.
- Dow, C. (1958). "The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch". *The Veterinary Record*, 70(49), pp.1102-1108.
- Dow, C. (1959). "The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch". *Journal of Comparative Pathology*, 69: pp.237-250.
- Fransson, B. A. & Ragle, C. A. (2003). "Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and Treatment". *Compendium*, 25(8), pp.602–612. Washington State University- Pullman.
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2004). "Canine female reproduction". In Feldman, E.C. & Nelson, R.W, *Canine and feline endocrinology and reproduction*. (3rded.) St. Louis: Saunders-Elsevier.

Gyles C.L. & Fairbrother J.M. (2010). "Escherichia coli", In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th ed. Iowa: Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. pp. 267-308.

Hagman, R. (2004). *New Aspects of Canine Pyometra - Studies on epidemiology and pathogenesis*. Ph.D. thesis. Uppsala, Sweden: Department of Small Animal Clinical Sciences, The Swedish University of Agricultural Sciences.

Hagman, R., Ronnberg, E. & Pejler, G. (2009). "Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors." *PLoS ONE* 4(11): e8039.

Hagman, R., Lagerstedt, A.S., Hedhammar, A., Egenvall, A., (2011). "A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra". *Theriogenology* 75, pp.1251–1257.

Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E., and Wagner, H. (2008). "The DNA sugar backbone 20 deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation". *Immunity*, 28, pp.315–323.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway". *The Biochemical journal*, 334 Pt 2, pp.297–314.

Holst, B. S., Gustavsson, M. H., Lilliehöök, I., Morrison, D., & Johannisson, A. (2013). "Leucocyte phagocytosis during the luteal phase in bitches". *Veterinary immunology and immunopathology*, 153(1-2), pp.77–82.

Ishii, K. J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., & Akira, S. (2008). "Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections". *Cell host & microbe*, 3(6), pp.352–63.

Jason, J., Archibald, L. K., Nwanyanwu, O. C., Byrd, M. G., Kazembe, P. N., Dobbie, H., Jarvis, W. R., *et al.* (2001). "Comparison of Serum and Cell-Specific Cytokines in Humans", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8(6), pp.1097–1103.

Jeffcoate, I. (1998). *BSAVA Manual of small animal reproduction and neonatology*. (G. M. Simpson, Ed.) (pp. 1-8). British Small Animal Veterinary Association.

Johnson, C. A. (1995) "Cystic endometrial hyperplasia, pyometra, and infertility. In: Ettinger SJ, Feldman EC, ed. *Textbook of veterinary internal medicine*, ed 4. Philadelphia: Saunders; 1636.

Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R. & Olson, P.N.S. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, a, Wang, L., Karlstam, E., & Wernersson, S. (2012). "Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra". *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, pp. 337–41.

Kawai, T., & Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors". *Nature immunology*, 11(5), pp. 373–84.

Kawai, T., & Akira, S. (2011). "Toll-Like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity". *Immunity*, 34(5), pp. 637–50.

KerKelä, E., Saarialho-Kere, U. (2003). "Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer." *Experimental Dermatology*, 12: pp. 109-25.

Kustritz, M.V.R. (2005). "Cystic endometrial hyperplasia and pyometra". In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine, volume 2*. (6th ed.). pp. 1676-1680. St. Louis: Saunders.

Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L., Silva, E. (2013). "Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin". *Veterinary Microbiology*. 166 (3-4); 590-594.

Medzhitov R, Janeway C Jr. (2000) "Innate immunity". *The New England Journal of Medicine*; 343, pp. 338-44.

Neill, L. A. J. O., Bryant, C. E., & Doyle, S. L. (2009). "Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer", *Pharmacological Reviews*, 61(2), pp. 177–197.

Noakes, D.E., Parkinson, T.J. & England, G.C.W. (2001). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics* (8th ed.). London: Saunders-Elsevier.

Payan Carreira, R. e Pires, M.A. (2005). "Hiperplasia quística do endométrio em cadelas", *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Rev., 100, pp.5-16.

Pretzer DS (2008) "Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review", *Theriogenology*, 70, pp. 359-363.

Senger, P. L. (2003). Current conceptions Inc. (2º Revised Edition) *Pathways to pregnancy and parturition*, pp.151, Washington State University, Pullman, Washington.

Sheldon, I. M., & Roberts, M. H. (2010). "Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium". *PloS one*, 5(9).

Silva, E., Leitão, S., Ferreira-Dias, G., Lopes da Costa, L., Mateus, L., (2009). Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. *Reproductive Domestic Animal* 44 (Suppl. 2), pp. 200–203.

Silva, E., Leitão, S., Henriques, S., Kowalewski, M.P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G., Lopes da Costa, L., Mateus, L., (2010). "Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia–pyometra complex". *Journal of reproductive immunology*. 84, pp. 66–74.

Silva, E., Henriques, S., Brito, S., Ferreira-Dias, G., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2012). "Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium". *Journal of reproductive immunology*, 96(1-2), pp. 45–57.

Smith OF (2006) "Canine pyometra", *Theriogenology* 66, pp. 610-612.

Szabo, K., Ablin, R., Singh, G. (2004). "Matrix metalloproteinases and the immune response." *Clinical and Applied Immunology Rev* 4: pp. 295-319.

Tizard, I. (2008). *Veterinary Immunology- An Introduction*. Philaelphia, WB Saunders Company: pp. 286-296.

Verstegen, J., Dhaliwal, G., & Verstegen-Onclin, K. (2008). "Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success". *Theriogenology*, 70(3), pp. 364-374.

Weiss, R.R., Calomeno, M.A., Sousa, R.S., Briersdorf, S.M., Calomeno, R.A., Muradás, P. (2004). "Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piómetra na cadela". *Archives Veterinary Science* 9 (2), pp. 81–87.

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., & Mori, T. (2010). Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *Journal of biochemistry*, 147(6), 781–92.

Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., Alexander, C., (2008). "TLR2—promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity". *Immunobiology* 213, pp. 205–224.